



**Departamento
de Química Orgánica**

**Síntesis de iminoazúcares sp^2 y evaluación de su actividad
como chaperonas farmacológicas para el tratamiento de las
enfermedades de Gaucher, Fabry y gangliosidosis GM_1 .**

**Teresa Mena Barragán
Sevilla, 2013**



**Departamento
de Química Orgánica**

**Síntesis de iminoazúcares sp^2 y evaluación de su actividad
como chaperonas farmacológicas para el tratamiento de las
enfermedades de Gaucher, Fabry y gangliosidosis GM_1 .**

Memoria presentada por la
Licenciada Teresa Mena Barragán
para optar al grado de Doctor en Química

Sevilla, 2013

El presente trabajo ha sido realizado por la Lcda. Teresa Mena Barragán en el Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Química de la Universidad de Sevilla, bajo la dirección de la Dra. Carmen Ortiz Mellet, Catedrática de Química Orgánica de la Universidad de Sevilla y del Dr. José Manuel García Fernández, Profesor de Investigación del Instituto de Investigaciones Químicas del CSIC.

Los directores del trabajo:

Fdo.: Dra. Carmen Ortiz Mellet

Fdo.: Dr. José Manuel García Fernández

FINANCIACIÓN

Este proyecto ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (*Glicobióticos, Glicofármacos y Glicotransportadores: Aplicaciones en Nutrición y Biomedicina*, SAF2010-15670), la Junta de Andalucía (*Diseño de Inhibidores de Glicosidasas para el Tratamiento de Enfermedades Lisosomales: Síntesis de sp^2 -iminozúcares y Evaluación en Terapias de Acompañante Químico*, P08-FQM-03711), la Fundación Ramón Areces y la Fundación Europea para el Desarrollo Regional (FEDER).

La doctoranda ha sido financiada mediante una beca predoctoral de la Junta de Andalucía durante el período 2009-2013.

ABREVIATURAS

A

ABX	Ambroxol
Ac	Acetilo
ac.	Acuoso
Ac ₂ O	Anhídrido acético
AcOEt	Acetato de etilo

B

Bn	Bencilo
Boc	<i>tert</i> -Butoxicarbonilo
Boc ₂ O	Di- <i>tert</i> -butil dicarbonato
^t BuOH	<i>tert</i> -Butanol
^t BuOK	<i>tert</i> -Butóxido de potasio

C

°C	Grados Celsius
CD	Ciclodextrina
conc.	Concentrado
CF	Fibrosis quística
COS-7	Línea celular derivada de células de fibroblastos de riñón de mono verde africano
COSY	<i>Correlated Spectroscopy</i>

CuAAC	<i>Cu (I)-catalyzed Azide-Alkyne Coupling</i>
cuant.	Cuantitativo

D

δ	Desplazamiento químico
DADP	2,5-Didesoxi-2,5-imino-D-alitol
DADLP	2,5-Didesoxi-2,5-imino-D-altritol
DAJNac	2-Acetamido-1,2-didesoxi-D-alonojirimicina
DAPI	4',6-Diamidino-2-fenilindol
DBU	1,8-Diazabicyclo undec-7-eno
DCC	<i>N,N'</i> -Diciclohexilcarbodimida
DGJ	1-Desoxigalactonojirimicina
DGJNac	2-Acetamido-1,2-didesoxi-D-galactonojirimicina
DIJ	1-Desoxiidonojirimicina
DMAP	4-(Dimetilamino)piridina
DMDP	2,5-Didesoxi-2,5-imino-D-manitol
DME	1,2-Dimetoxietano
DMF	<i>N,N</i> -Dimetilformamida
DMJ	1-Desoximanonojirimicina
DMJNac	2-Acetamido-1,2-didesoxi-D-manonojirimicina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNJ	1-Desoxinojirimicina
DNJNac	2-Acetamido-1,2-didesoxi-D-nojirimicina
dppe	1,2-Bis(difenilfosfino)etano

E

ERT	<i>Enzyme Replacement Therapy</i>
ERAD	<i>Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation</i>
ESI	<i>Electrospray Ionization</i>
Et	Etilo
Et ₃ N	Trietilamina

F

FAB	<i>Fast Atom Bombardment</i>
FD	<i>Fabry Disease</i>
FDG	5'-Pentafluorobenzoilaminofluorescein-di- β -D-glucoside
185FF02	Línea celular derivada de fibroblastos de pacientes de Gaucher
FRET	<i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>

G

G	Energía libre de Gibbs
α -Gal A	α -Galactosidasa ácida humana
β -Gal	β -Galactosidasa ácida humana
Galasa	Galactosidasa
GBA2	β -Glucosilceramidasa neutra

prGCD	β -Glucocerebrosidasa recombinante
GCS	β -Glucosilceramida sintasa
GD	<i>Gaucher Disease</i>
GJ	Galactonojirimicina
Glcasa	Glucosidasa
GlcCasa o	
GBA1	β -Glucocerebrosidasa
GlcCer	Glucocerebrósido
β -GlcNAcasa	<i>N</i> -acetil- β -glucosaminidasa

H

H	Entalpía
HPLC	<i>High-Performance Liquid Chromatography</i>

I

IC ₅₀	Concentración inhibitoria del 50%
IFG	Isofagomina
IR	Espectroscopía infrarroja
ITC	<i>Isothermal Titration Calorimetry</i>

K

K	Kelvin
K_i o K_d	Constante de inhibición o disociación
K_a	Constante de asociación

L

LDH	Lactato deshidrogenasa
LSD	<i>Lysosomal Storage Disorder</i>
λ_{em}	Longitud de onda de emisión
λ_{exc}	Longitud de onda de excitación

M

MALDI-TOF	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization- Time Of Fligh</i>
Me	Metilo
MED91AD	Línea celular derivada de fibroblastos de pacientes de Gaucher
Ms	Mesilo
4-MU	4-Metilumbeliferona- α -D-glucopiranosido
MW	Radiación microondas
m/z	Relación masa/carga

N

NB-DNJ	<i>N</i> -butildesoxinojirimicina
NN-DNJ	<i>N</i> -nonildesoxinojirimicina
6N-DNJ	6-Amino-1,6-didesoxinojirimicina
NJ	Nojirimicina
NMO	<i>N</i> -óxido de la <i>N</i> -metilmorfolina

NN-DNJ	<i>N</i> -nonildesoxinojirimicina
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
NOEV	<i>N</i> -octil-4- <i>epi</i> - β -valienamina

P

4-PBA	Ácido 4-fenilbutírico
PC	<i>Pharmacological Chaperone</i>
PCT	<i>Pharmacological Chaperone Therapy</i>
PEG	Polietilénglicol
Ph	Fenilo
PRT	<i>Proteostasis Regulator Therapy</i>
PTSA	Ácido <i>p</i> -toluensulfónico
py	Piridina

R

RE	Retículo endoplasmático
RMN	Resonancia magnética nuclear
rt	<i>Room temperature</i>

S

S	Entropía
SRT	<i>Substrate Reduction Therapy</i>

T

T	Temperatura
t.a.	Temperatura ambiente
TBAF	Fluoruro de tetrabutilamonio
TFA	Ácido trifluoroacético
Tf ₂ O	Anhídrido trifluorometanosulfónico
THF	Tetrahidrofurano
<i>TmGH1</i>	<i>Thermotoga maritima</i>
t _R	Tiempo de retención

U

UV-vis	Ultravioleta-visible
--------	----------------------

W

WT	<i>Wild Type</i>
----	------------------

RELACIÓN DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1.1. Anatomía del interior celular.	1
Figura 1.2. Prevalencia de las enfermedades de almacenamiento lisosomal.	4
Figura 1.3. Distribución global de las enfermedades de almacenamiento lisosomal.	8
Figura 1.4. Clasificación de las terapias para las LSDs.	9
Figura 1.5. Estructuras de Zavesca y Eliglustat.	10
Figura 1.6. Representación esquemática de la estrategia de PCT para el tratamiento de LSDs.	11
Figura 1.7. Comparación de ventajas de PCT como monoterapia y combinada con ERT.	12
Figura 1.8. Hidrólisis enzimática del enlace glicosídico.	13
Figura 1.9. Estructuras generales de los iminoazúcares naturales.	14
Figura 1.10. Estructuras de algunos derivados bajo estudio como PCs.	14
Figura 1.11. Estructura del derivado trivalente (DNJ₃).	17

Capítulo 3

Figura 3.1. Estructuras de derivados bajo estudio como PCs para GD.	40
Figura 3.2. (A) Estructura de los iminozúcares incluidos en el estudio cristalográfico con la β -glucosidasa de <i>Thermotoga maritima</i> . (B) Estructura de los complejos entre TmGH1 y 160 , 162 y 163 .	41
Figura 3.3. Estructuras de los iminozúcares incluidos en el este estudio cristalográfico con prGCD.	43
Figura 3.4. Comparación de las regiones del sitio activo de los complejos de NB-DNJ y 164 con prGCD.	44
Figura 3.5. Estructuras de los iminoazúcares clásicos de configuración L-ido como inhibidores de GCS sintetizados por Aerts y Overkleeft.	45
Figura 3.6. Espectros de ^1H y ^{13}C RMN (500 MHz, 125.7 MHz, CD_3OD) del 2 .	48
Figura 3.7. Espectros de ^1H y ^{13}C RMN (500 MHz, 125.7 MHz, CD_3OD) de 5 .	49

Figura 3.8. Representación Lineweaver-Burk para la determinación de K_i (45 nM) de 5 frente a la β -glucosidasa (almendra; pH 7.3).	52
Figura 3.9. Espectros ^1H y ^{13}C RMN (500 MHz, 125.7 MHz, acetona- d_6 /D $_2$ O 9:1, 313 K) de 10 .	54
Figura 3.10. Espectros ^1H y ^{13}C RMN (500 MHz, 125.7 MHz, acetona- d_6 /D $_2$ O 9:1) de 14 .	55
Figura 3.11. Biosíntesis y catabolismo de la GlcCer.	58
Figura 3.12. Estructuras de los iminoazúcares incluidos en el estudio relacionado con la biosíntesis y catabolismo de GlcCer.	59
Figura 3.13. Efecto sobre la actividad de GlcCasa de los derivados seleccionados a diferentes concentraciones en fibroblastos humanos sanos.	61
Figura 3.14. Estructura de FDG.	61
Figura 3.15. Efecto <i>in vivo</i> de los derivados de DNJ sobre la actividad de GlcCasa a diferentes concentraciones de iminoazúcar (0.1-10 x IC $_{50}$) en células intactas.	62
Figura 3.16. Estructura del marcador ultrasensible MDW941 desarrollado por Aerst.	63
Figura 3.17. Representación de la interacción irreversible entre el marcador ultrasensible MDW941 y la enzima mediante la apertura del epóxido por el carboxilato del sitio activo y formación del éster.	64
Figura 3.18. Efecto <i>in vivo</i> sobre la actividad de GlcCasa en células marcadas con un exceso (100 nM) de MDW941 .	65
Figura 3.19. Efecto <i>in vivo</i> sobre la actividad de GlcCasa en células marcadas con un defecto (1 nM) de MDW941 .	65
Figura 3.20. Efecto de los iminoazúcares 168 y 2 sobre la actividad de GlcCasa en fibroblastos humanos normales.	66
Tabla 3.21. Efecto de los iminoazúcares 168 y 2 sobre la actividad de GlcCasa en fibroblastos humanos mutantes N370S/ N370S (línea celular 185FF02).	66
Figura 3.22. Efecto de los iminoazúcares 168 y 2 sobre la actividad de GlcCasa en fibroblastos humanos mutantes N370S/ N370S (línea celular 185FF02).	67
Figura 3.23. Espectros de ^1H y ^{13}C RMN (500 MHz, 125.7 MHz, 328 K, CD $_3$ CN) de 15 .	70

Capítulo 4

Figura 4.1. Análisis configuracional-conformacional de la interacción del sustituyente pseudoaglicónico con los bolsillos hidrofóbicos de las glicosidasas lisosomales.	78
Figura 4.2. Espectros de ^1H y ^{13}C RMN (300 MHz, 75.5 MHz, CD_3OD , 313 K) de 24 .	84
Figura 4.3. Espectros de ^1H y ^{13}C RMN (300 MHz, 75.5 MHz, CD_3OD) de 34 .	84
Figura 4.4. Representación de tipo Lineweaver-Burk para la determinación de K_i (0.008 μM) de 27 frente a la α -Galasa (grano de café; pH 6.8).	88
Figura 4.5. Representación de tipo Lineweaver-Burk para la determinación de K_i (0.08 μM) de 38 frente a la β -Galasa (hígado de buey; pH 7.3).	89
Figura 4.6. Equilibrio entre los derivados bicíclicos de DGJ y sus sales.	91
Figura 4.7. Determinación del valor de $\text{p}K_a$ de 29 mediante ^1H RMN.	92
Figura 4.8. Determinación del valor de $\text{p}K_a$ de 31 mediante ^1H RMN.	93
Figura 4.9. Determinación del valor de $\text{p}K_a$ de 36 mediante ^1H RMN.	94
Figura 4.10. Representación de los espectros de excitación y emisión de un par de fluoróforos entre los que se produce transferencia de energía.	95
Figura 4.11. Representación del fenómeno FRET entre el triptófano y la sonda fluorescente dansilo.	96
Figura 4.12. Extinción (“quenching”) de la fluorescencia del triptófano de la β -Glcasa de almendra por adición de cantidades variables del iminoazúcar 34 .	97
Figura 4.13. Determinación de la estequiometría del complejo 34 - β Glcasa de almendra ($\lambda_{\text{exc}} = 340 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 511 \text{ nm}$).	98
Figura 4.14. Isotherma de asociación para el complejo 34 - β Glcasa de almendra	98
Figura 4.15. Estructura de los derivados monocíclicos incluidos en el estudio de estabilidad térmica de la α -Gal A.	100
Figura 4.16. Efecto de los derivados 20 , 21 , 23 y 24 en la protección de α -Gal A frente a la degradación térmica inducida <i>in vitro</i> en lisados de fibroblastos humanos sanos (A) o en lisados de fibroblastos derivados de la mutación homocigótica R301G (B) a 48 °C y pH 7.0.	102

Figura 4.17. Efecto de los derivados 22, 25-28 en la protección de α -Gal A en la degradación térmica inducida <i>in vitro</i> en lisados de fibroblastos humanos sanos a 48 °C y pH 7.0.	103
Figura 4.18. Estructura de los derivados monocíclicos 20, 21, 23 y 24 .	104
Figura 4.19. Actividad de los derivados 20, 21, 23 y 24 como PCs en fibroblastos humanos sanos y mutantes R301G de pacientes de FD en función del tiempo.	105
Figura 4.20. Actividad como PCs de los derivados 20, 21, 23 y 24 en comparación con DGJ en fibroblastos humanos sanos y mutantes (R301G) de FD.	106
Figura 4.21. Estructura de los derivados monocíclicos aromáticos 22 y 25-28 y de su actividad como PCs en comparación con DGJ en fibroblastos mutantes (Q279E) de FD.	107
Figura 4.22. Efecto chaperona de los derivados 20, 21, 23 y 24 (30 μ M) en comparación con DGJ (20 μ M) sobre la α -Gal A expresada en células COS.	108
Figura 4.23. Efecto chaperona de los derivados 21 y 25-27 en comparación con DGJ sobre la α -Gal A en células COS transfectadas que expresan la mutación E66Q.	109
Figura 4.24. Efecto chaperona de los derivados 21 y 25-27 en comparación con la DGJ empleando células COS transfectadas con la mutación A20P.	109
Figura 4.25. Efecto chaperona de los derivados 20 y 25-28 en comparación con DGJ sobre la α -Gal A en fibroblastos humanos normales.	110
Figura 4.26. Estudio de citotoxicidad en fibroblastos humanos sanos para los derivados 22 y 25-28 en comparación con DGJ.	111
Figura 4.27. Mecanismo para la degradación del material celular dañado.	112
Figura 4.28. Efecto de 25 y 27 en los niveles de expresión de proteínas asociadas a los autofagosomas en cultivos celulares de fibroblastos humanos de Fabry Q279E.	113
Figura 4.29. Estructuras químicas de 4-PBA y celastrol.	114
Figura 4.30. Efecto producido por combinación de PCT (25) con la presencia de una chaperona molecular o un regulador de la proteostasis en cultivos celulares de fibroblastos humanos mutantes Q279E.	115
Figura 4.31. Estructura química del NOEV y de los derivados bicíclicos 29 y 30 .	116

Figura 4.32. Actividad chaperona de los derivados 29 y 30 en fibroblastos humanos mutantes (R201C) de pacientes de gangliosidosis GM ₁ .	118
Figura 4.33. Perfil de inhibición del derivado 29 frente a enzimas lisosomales humanas y estudio de protección de β -Gal <i>in vitro</i> .	119
Figura 4.34. Predicción tridimensional del complejo β -Gal- 29 mediante simulación computacional.	120
Figura 4.35. Efecto chaperona de 29 en fibroblastos intactos humanos que presentan deficiencia de β -Gal.	121
Figura 4.36. Efecto chaperona de 29 sobre una colección de β -Gal mutantes en células COS7.	122
Figura 4.37. Efecto de 29 y de NOEV sobre la actividad enzimática (A) y la reducción del gangliósido GM ₁ (B) en cultivos celulares de fibroblastos de ratones que expresan β -Gal normal (GP8) o β -Gal mutantes.	123
Figura 4.38. Efecto de 29 en la disminución de gangliósido GM ₁ en cultivos celulares de fibroblastos de ratones que expresan β -Gal normal (GP8) o β -Gal mutantes.	124
Figura 4.39. Efecto de 29 y NOEV en la reducción del nivel de expresión de proteínas asociadas a los autofagosomas en fibroblastos de ratones que expresan β -Gal mutantes.	126
Figura 4.40. (A) Efecto de 29 en la actividad enzimática de β -Gal en lisados de fibroblastos procedentes de la corteza cerebral y del cerebro. (B) Secciones de la corteza cerebral de ratones R201C tratados con 29 . (C) Efecto de 29 en la expresión de proteínas asociadas a autofagosomas en el cerebro de ratones afectados por la mutación R201C.	127
Figura 4.41. Estructura de los derivados incluidos en el estudio de complejación con la β -Gal recombinante.	128
Figura 4.42. Interacciones entre la β -Gal humana recombinante y NOEV.	129
Figura 4.43. Interacciones entre la β -Gal humana recombinante y 29 .	131
Figura 4.44. Interacciones entre la β -Gal humana recombinante y 185 .	132
Figura 4.45. Interacciones entre la β -Gal humana recombinante y 19 .	133

Figura 4.46. Estructura cristalográfica de β -Gal normal (<i>wild type</i>) y mutante (I51T) complejada con 29 y D-galactosa.	134
---	-----

Capítulo 5

Figura 5.1. Activación de la aspirina por la acción de las enzimas intestinales.	141
Figura 5.2. Activación del omeprazol en el medio ácido del estómago.	142
Figura 5.3. Ejemplos de funciones sensibles a pH ácido y productos de hidrólisis.	143
Figura 5.4. Representación del modo de acción de polímeros sensibles al cambio de pH.	144
Figura 5.5. Polímeros funcionalizados con grupo ortoéster descritos por M. Bessodesy F.C. Szoka.	145
Figura 5.6. Conjugados PEG-fenilalanina funcionalizados con ortoésteres descritos por A. T. Jones.	146
Figura 5.7. Representación de PCs como <i>profármacos</i> “reversos”.	147
Figura 5.8. Estructura del derivado NOT-AIJ.	147
Figura 5.9. Espectros de ^1H y ^{13}C RMN (500 MHz, 125.7 MHz, 9:1 acetona- d_6 /D $_2$ O, 313 K) de 79 .	155
Figura 5.10. Espectros de ^1H y ^{13}C RMN (500 MHz, 125.7 MHz, 9:1 acetona- d_6 /D $_2$ O, 313 K) de 81 .	156
Figura 5.11. Comparación de la actividad inhibitoria de los derivados 77-79 , 81 y el Ambroxol frente a la GlcCasa a diferentes valores de pH.	160
Figura 5.12. Efecto de los iminoazúcares derivados de DNJ 77-79 en la actividad de fibroblastos mutantes de GlcCasa.	161
Figura 5.13. Espectros de ^1H y ^{13}C RMN (500 MHz, 125.7 MHz, CD $_3$ OD) de 91 .	163
Figura 5.14. Espectros de ^1H y ^{13}C RMN (500 MHz, 125.7 MHz, CD $_3$ OD) de 97 .	164
Figura 5.15. (A) Comparación de los cromatogramas de HPLC (columna C18, gradiente H $_2$ O-MeCN) mostrando las proporciones relativas de 77 y del producto de hidrólisis 81 en función del tiempo a pH 5.5. (B) Perfil de hidrólisis del derivado 77 a pH 7.3 y 5.5.	167

Figura 5.16. Variación de las proporciones relativas de 88 y 94 durante la hidrólisis del grupo ortoéster a pH 5.5.	168
Figura 5.17. Velocidad de hidrólisis del derivado 88 (130 μ M) a pH 5.0 y 37 °C.	168
Figura 5.18. Velocidad de hidrólisis del derivado 88 (1 mM) a pH 5.0 y 37 °C.	169
Figura 5.19. Velocidad de hidrólisis del derivado 89 (80 μ M) a pH 5.0 y 37 °C.	169

Capítulo 6

Figura 6.1. Estructura de la swansonina.	176
Figura 6.2. Estructura química del fullereno C ₆₀ , nanotubo de carbono y grafeno.	178
Figura 6.3. Estructura del fullereno C ₆₀ y de las cúpulas geodésicas y representación de fullerenos de diferente peso molecular.	179
Figura 6.4. Tipos de enlaces diferentes en los fullerenos.	180
Figura 6.5. Reactividad del C ₆₀ frente a la adición de nucleófilos y a las cicloadiciones.	181
Figura 6.6. Mecanismo de la reacción de ciclopropanación de Bingel.	182
Figura 6.7. Representación de un hexaaducto de fullereno C ₆₀ con indicación de su simetría tetraédrica.	182
Figura 6.8. Formación del bromocarbanión para la persustitución del C ₆₀ con grupos alquinos.	183
Figura 6.9. Ejemplos de estructuras dodecavalentes basadas en hexaaductos de fullereno.	184
Figura 6.10. Espectro ¹³ C RMN (100.6 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) de 102 .	187
Figura 6.11. Representación de tipo Lineweaver-Burk para la determinación de <i>K_i</i> (0.15 μ M) de 102 frente a la α -Manasa (judía Jack; pH 5.5).	190
Figura 6.12. Estructura general de la β CD con indicación del tamaño de la cavidad y la posibilidad de funcionalizar ambas caras de modo diastereoselectivo.	191
Figura 6.13. Espectros de ¹ H y ¹³ C RMN (500 MHz, 333 K; 125.7 MHz, 313 K, CD ₃ OD) de 118 .	200
Figura 6.14. Espectro de masas en modo MALDI-TOF de 119 .	201

Figura 6.15. Representación de tipo Lineweaver-Burk Plot para la determinación de los valores de K_i (0.36 μM) y K_i' (1.2 μM) de 119 frente a la α -Manasa (judía Jack; pH 5.5).	203
Figura 6.16. Representación de tipo Lineweaver-Burk Plot para la determinación del valor de K_i (0.022 μM) de 118 frente a la α -Manasa (judía Jack; pH 5.5).	204
Figura 6.17. Estructuras de los derivados multivalentes incluidos en el estudio termodinámico mediante valoración ITC.	208
Figure 6.18. (A) Termograma e (B) isoterma de unión de 119 y α -Manasa (pH 5.5, 25 $^{\circ}\text{C}$).	211
Figura 6.19. Representación gráfica de ΔH vs $T\Delta S$ en las interacciones de la enzima α -Manasa con los derivados multivalentes $\beta\text{CD-DNJ}$ 102 , 119 , 127 , 133 y 134 y $\beta\text{CD-DMJ}$ 123 .	212

Capítulo 7

Figura 7.1. Iminoazúcares naturales con estructura de pirrolidina.	221
Figura 7.2. Estructuras de los derivados DADP y DALDP.	222
Figura 7.3. Estructura de las pirrolidinas de configuración D- y L- <i>gluco</i> y <i>altro</i> y de las dos formas <i>meso</i> (<i>galacto</i> y <i>alo</i>).	223
Figura 7.4. Estructura de las pirrolidinas de configuración D- y L- <i>ido</i> y <i>mano</i> que completan la serie de los 10 estereoisómeros 2,5-didesoxi-2,5-iminohexitoles diferentes.	224
Figura 7.5. Estrategia de síntesis propuesta para la obtención de las pirrolidinas objetivos.	225
Figura 7.6. Estrategia sintética para la preparación de pirrolidinas de configuración L- <i>ido</i> a partir de la D-glucuronolactona.	225

Capítulo 8

- Figura 8.1.** Estructuras de la nojirimicina (NJ), de su derivado 1-desoxi (DNJ), y de los análogos diatereoisoméricos 2-acetamido-1,2-didesoxi iminoazúcares con configuración D-*gluco*- (DNJNAc), D-*galacto*- (DGJNAc), D-*mano*- (DMJNAc) y D-*alo*- (DAJNAc). 234
- Figura 8.2.** Estructuras cristalinas de los *N*-acetamidodiolcarbamatos **156** (D-*alo*) y **157** (D-*galacto*). 238
- Figura 8.3.** Representación de tipo Lineweaver-Burk Plot para la determinación del valor de K_i (2.6 μ M) de DAJNAc frente a la *N*-acetil- β -glucosaminidasas (riñón de buey; pH 5.5). 240
- Figura 8.4.** Representación de tipo Lineweaver-Burk Plot para la determinación del valor de K_i (5.6 μ M) de DAJNAc frente a la *N*-acetil- β -glucosaminidasas (placenta humana; pH 5.5). 240
- Figura 8.5.** Estructuras de la pirrolidina **212**, 2-acetamido-2-desoxinojirimicina **213** y nagstatina **214**, los inhibidores más potentes de la β -*N*-acetilglucosaminidasa de placenta humana, judía Jack beans y riñón de buey, respectivamente. 241

RELACIÓN DE ESQUEMAS**Capítulo 3**

- Esquema 3.1.** Preparación de derivados mono y bicíclicos de DNJ. 46
- Esquema 3.2.** Mecanismo de formación de derivados bicíclicos de DNJ a partir de los derivados monocíclicos. 47
- Esquema 3.3.** Preparación de los derivados mono y bicíclicos de L-DIJ. 53
- Esquema 3.4.** Síntesis de los derivados *N,N*-ditioureidos de 6N-DNJ. 69

Capítulo 4

- Esquema 4.1.** 4.1 Preparación de derivados mono y bicíclicos de DGJ no reductores. 79
- Esquema 4.2.** Preparación del isotiocianato precursor **40**. 80

Esquema 4.3. Ensayo de preparación del derivado 182 .	81
Esquema 4.4. Preparación del derivado monocíclico fluorescente de DGJ 24 .	82
Esquema 4.5. Preparación del derivado bicíclico fluorescente de DGJ 34 .	82

Capítulo 5

Esquema 5.1. Síntesis de isotiocianatos funcionalizados con grupo ortoéster.	149
Esquema 5.2. Mecanismo propuesto por Boas para la síntesis bajo catálisis básica de isotiocianatos a partir de la amina correspondiente usando Boc ₂ O y DMAP.	151
Esquema 5.3. Mecanismo de hidrólisis de los ortoésteres.	151
Esquema 5.4. Síntesis de isotiocianatos correspondientes a la hidrólisis del grupo ortoéster.	152

Capítulo 6

Esquema 6.1. Síntesis del conjugado monovalente derivado de DNJ 101 .	185
Esquema 6.2. Síntesis del conjugado dodecavalente DNJ-[C ₆₀] 102 .	186
Esquema 6.3. Síntesis de <i>N</i> -alquilazidas y <i>N</i> -alquiltriazoles derivados de DNJ.	192
Esquema 6.4. Preparación de conjugados heptavalentes DNJ-βCD.	193
Esquema 6.5. Síntesis de conjugados tetradecavalentes DNJ-βCD funcionalizados en las caras primaria y secundaria de la βCD.	194
Esquema 6.6. Síntesis de conjugados tetradecavalentes DNJ-βCD funcionalizados en la cara secundaria de la βCD.	195
Esquema 6.7. Síntesis de conjugados monovalentes derivados de DMJ.	196
Esquema 6.8. Síntesis de conjugados heptavalentes DMJ-βCD.	197
Esquema 6.9. Síntesis del conjugado tetradecavalente DMJ-βCD funcionalizado en las caras primaria y secundaria de la βCD.	198
Esquema 6.10. Síntesis del control monovalente 104 .	198
Esquema 6.11. Síntesis del control multivalente 124 .	199

Capítulo 7

Esquema 7.1. Preparación del derivado 137 .	226
Esquema 7.2. Preparación del derivado 140 .	227
Esquema 7.3. Preparación de los derivados 142 y 144 .	228

Capítulo 8

Esquema 8.1. Preparación de los <i>N</i> -acetamidodiolcarbamatos 156 (D- <i>alo</i>) y 157 (D- <i>galacto</i>).	235
Esquema 8.2. Preparación del complejo estable de Pd-alilo 211 .	237
Esquema 8.3. Síntesis de DAJNAc 158 y DGJNAc 159 .	238

RELACIÓN DE FIGURAS

Capítulo 1

Tabla 1.1. Clasificación de algunas de las LSDs de mayor prevalencia.	5
Tabla 1.2. Resumen de los derivados más destacados bajo estudio como PCs.	15

Capítulo 3

Tabla 3.1. Comparación de la actividad como inhibidores de glicosidasas (K_i , μM) para los derivados de DNJ.	51
Tabla 3.2. Comparación de la actividad como inhibidores de glicosidasas (K_i , μM) para los derivados de L-DIJ.	56
Tabla 3.3. Comparación de la actividad como inhibidores de GlcCasa, GBA2 y GCS (IC_{50} , μM) de los derivados seleccionados.	60
Tabla 3.4. Comparación de la actividad como inhibidores de glicosidasas (K_i , μM) para los derivados de 6N-DNJ.	71

Capítulo 4

Tabla 4.1. Comparación de la actividad como inhibidores de glicosidasas (K_i , μM) para los derivados monocíclicos de DGJ.	86
Tabla 4.2. Comparación de la actividad como inhibidores de glicosidasas (K_i , μM) para los derivados bicíclicos de DGJ.	87
Tabla 4.3. Comparación de la actividad como inhibidores de glicosidasas comerciales (K_i , μM) y enzimas lisosomales humanas (IC_{50} , μM) de los derivados monocíclicos de DGJ en comparación con la DGJ.	100
Tabla 4.4. Comparación de la actividad como inhibidores de glicosidasas comerciales (K_i , μM) y lisosomales humanas (IC_{50} , μM) de los derivados bicíclicos de DGJ.	117

Capítulo 5

Tabla 5.1. Comparación de la actividad como inhibidores de glicosidasas (K_i , μM) para los derivados de DNJ.	157
Tabla 5.2. Comparación de la actividad como inhibidores de glicosidasas (K_i , μM) para los derivados de DGJ.	159
Tabla 5.3. Comparación de la actividad como inhibidores de glicosidasas (K_i , μM) para los derivados de 6-oxacalistergina B ₂ .	165

Capítulo 6

Tabla 6.1. Comparación de la actividad como inhibidores de glicosidasas (K_i , μM) para los derivados de DNJ mono y multivalente basado en fullereno [C_{60}]	188
Tabla 6.2. Comparación de la actividad como inhibidores de glicosidasas (K_i , μM) para los derivados de DNJ monovalentes 101, 109-111 .	202
Tabla 6.3. Comparación de la actividad como inhibidores de glicosidasas (K_i , μM) para los conjugados DNJ- βCD .	205
Tabla 6.4. Comparación de la actividad como inhibidores de glicosidasas (K_i , μM) para los derivados monovalentes y multivalentes DMJ- βCD .	206

Tabla 6.5. Relación de potencias relativas frente a α -Manasa de judía Jack para los conjugados multivalentes DNJ- β CD y DMJ- β CD. 207

Tabla 6.6. Parámetros termodinámicos de la interacción entre conjugados multivalentes de DNJ y DMJ y la α -Manasa. 210

Capítulo 8

Tabla 8.1. Rendimientos aislados de los productos de adición de nucleófilos nitrogenados a los ésteres **145** y **146** catalizada por Pd. 236

Tabla 8.2. Constantes de inhibición (K_i , μ M) frente a *N*-acetil- β -glucosaminidasas de DAJNAc y sus epímeros de configuración D-*gluco*- (DNJNAc) y D-*galacto* (DGJNAc). 239

El trabajo desarrollado en esta Tesis ha dado lugar a las siguientes publicaciones científicas:

1. *Dramatic Effect of Multivalency on Glycosidase Inhibition with Fullerene Iminosugar Balls*. P. Compain, C. Decroocq, J. Iehl, M. Holler, D. Hazelard, T. Mena Barragán, C. Ortiz Mellet, J.-F. Nierengarten, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 5889-5892; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 5753-5756.
2. *The Multivalent Effect in Glycosidase Inhibition: Probing the Influence of Architectural Parameters with Cyclodextrin-based Iminosugar Click Clusters*. C. Decroocq, D. Rodríguez-Lucena, V. Russo, T. Mena Barragán, C. Ortiz Mellet, P. Compain, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 13825-13831.
3. *Tuning glycosidase inhibition through aglycone interactions: Pharmacological Chaperones for Fabry disease and GM₁ gangliosidosis*. M. Aguilar-Moncayo, T. Takai, K. Higaki, T. Mena-Barragán, Y. Hirano, K. Yura, L. Li, Y. Yu, H. Ninomiya, M. I. García-Moreno, S. Ishii, Y. Sakakibara, K. Ohno, E. Nanba, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, Y. Suzuki, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 6514-6516.
4. *A bicyclic 1-deoxygalactonojirimycin derivative as a novel pharmacological chaperone for GM₁ gangliosidosis*. T. Takai, K. Higaki, M. Aguilar-Moncayo, T. Mena-Barragán, Y. Hirano, K. Yura, L. Yu, H. Ninomiya, M. I. García-Moreno, Y. Sakakibara, K. Ohno, E. Nanba, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, Y. Suzuki, *Mol. Ther.* **2013**, *21*, 526-532.
5. *The Multivalent Effect in Glycosidase Inhibition: Probing the Influence of Valency, Peripheral Ligand Structure and Topology with Cyclodextrin-based*

- Iminosugar Click Clusters.* C. Decroocq, A. Joosten, R. Sergent, T. Mena Barragán, C. Ortiz Mellet, P. Compain, *ChemBioChem* **2013**, *14*, 1-13.
- 6.** *Stereoselective Synthesis of 2-Acetamido-1,2-dideoxyallonojirimycin (DAJNAc), a New Potent Hexosaminidase Inhibitor.* A. de la Fuente, R. Martín, T. Mena-Barragán, X. Verdaguer, J. M. García Fernández, C. Ortiz Mellet, A. Riera, *Organic Letters* **2013**, *15*, 3638-3641.

Resumen

RESUMEN

Las enfermedades de depósito lisosomal (*Lysosomal Storage Disorders*, LSDs), entre las que se encuentran la enfermedad de Gaucher (GD), la enfermedad de Fabry (FD) y la gangliosidosis GM₁ (GM1) son un conjunto de enfermedades de carácter genético que afectan a un bajo porcentaje de la población mundial. Para la mayoría de ellas no se dispone aún de tratamiento eficaz. Se caracterizan por la disfunción de alguna de las enzimas encargadas de degradar glicoesfingolípidos en el interior del lisosoma. En muchos de los casos, la mutación genética en el origen de la enfermedad conlleva una modificación en la secuencia de aminoácidos de la proteína afectada que altera el plegamiento correcto de la misma. Las enzimas defectuosas son derivadas durante su biosíntesis hacia el proteosoma por el mecanismo de control de calidad del retículo endoplasmático y degradadas, no alcanzando por tanto su destino. Esto conduce a la acumulación del correspondiente sustrato en el lisosoma lo que, a su vez, da lugar a una variedad de patologías en general de carácter muy grave. Aunque en algunos casos la administración de la correspondiente enzima recombinante ha permitido mejorar enormemente la calidad de vida de los pacientes afectados, esta aproximación terapéutica no es hoy por hoy aplicable cuando existen implicaciones en el sistema nervioso central. El diseño de moléculas capaces de forzar el plegamiento correcto, rescatar la enzima mutante y promover su tráfico al lisosoma representa una alternativa para estos casos y ha dado lugar a la estrategia conocida como *terapia de la chaperona farmacológica*.

Esta Tesis supone una contribución al desarrollo de chaperonas farmacológicas para GD, FD y GM₁ basadas en glicomiméticos con estructura de iminoazúcares sp². Compuestos de esta familia han demostrado comportarse como inhibidores potentes y selectivos de glicosidasas, incluyendo varias glicosidasas lisosomales humanas. A concentraciones subinhibitorias, son capaces de unirse a la enzima mutada en el retículo endoplasmático y acompañarla en su camino primero al aparato de Golgi para su maduración y luego al lisosoma, donde el exceso de sustrato los desplaza y el procesado

tiene lugar. Datos de difracción de rayos X de los correspondientes complejos iminoazúcar sp^2 -enzima y estudios de relaciones estructura-actividad han permitido seleccionar buenos candidatos como chaperonas farmacológicas que han sido evaluados en fibroblastos de pacientes, en células COS que expresan mutaciones relacionadas con LSDs e incluso *in vivo* en ratones transgénicos.

Un primer conjunto de los resultados obtenidos se refiere a la síntesis de dos nuevas familias de iminoazúcares sp^2 derivados de 1-desoxinojirimicina (DNJ) y de su análogo de configuración L-*ido* (L-DIJ) capaces de actuar sobre las enzimas que operan en la biosíntesis y degradación de la glucosilceramida, el glicoesfingolípido que se acumula en el caso de la enfermedad de Gaucher. En colaboración con los Profesores J. M. F. G. Aerts (Univ. Amsterdam) y H S. Overkleeft (Univ. Leiden), se ha determinado el aumento de la actividad intralisosomal en fibroblastos de Gaucher tras el tratamiento con las chaperonas, haciendo uso de “sondas de actividad” etiquetadas con marcadores fluorescentes. En ambas series se han identificado compuestos con buenas perspectivas para su utilización en el tratamiento de las patologías de GD.

La parte central de la Tesis se centra en el diseño de inhibidores específicos de la α -galactosidasa (α -Galasa) y de la β -galactosidasa (β -Galasa) lisosomales susceptibles de desarrollo como chaperonas farmacológicas para el tratamiento de la enfermedad de Fabry y de la gangliosidosis GM_1 , respectivamente. Hemos demostrado que la especificidad de acción de iminoazúcares sp^2 derivados de la 1-desoxigalactonojirimicina (DGJ) puede dirigirse hacia una u otra enzima actuando sobre la estructura del esqueleto de iminoazúcar: derivados monocíclicos presentan una elevada selectividad hacia α -Galasa en tanto que derivados bicíclicos lo hacen hacia la β -Galasa. Este cambio en la selectividad está gobernado por interacciones no glicónicas de carácter hidrófobo que, a su vez, requieren una orientación definida del sustituyente exocíclico sobre el grupo pseudoamida. En colaboración con los grupos de los Profesores Y. Suzuki (Univ. Otawara), K. Ohno y K. Higaki (Univ. Tottori, Japón) se ha evaluado el potencial como chaperonas farmacológicas de los nuevos derivados tanto *in vitro* en fibroblastos humanos

y en células COS que expresan mutaciones de FD o GM1 como, en el caso de la GM1, *in vivo* en ratones genéticamente modificados. Los resultados demuestran la capacidad de cruzar la barrera hematoencefálica y reducir el acúmulo de glicosfingolípidos en el cerebro de las chaperonas desarrolladas, revirtiendo de esta manera la enfermedad a nivel del tejido neuronal.

Dado que una chaperona farmacológica eficaz debe de unirse fuertemente a la enzima diana en el retículo endoplasmático (pH 7.3) pero disociarse en el lisosoma (pH 5.2), hemos explorado la incorporación de un grupo ortoéster, sensible al pH, en el diseño de una nueva generación de iminoazúcares sp^2 derivados de DNJ y DGJ. Este grupo conecta el núcleo de iminoazúcar con el sustituyente hidrofóbico, de manera que la hidrólisis a pH 5.5 o inferior conduce a una pérdida importante de afinidad. El concepto se ha aplicado a la preparación de chaperonas farmacológicas para GD y FD.

Nuestro interés en nuevas aproximaciones para modular la potencia y selectividad de los iminoazúcares como inhibidores de glicosidasas, con miras a sus aplicaciones en diferentes patologías, nos ha llevado a explorar el efecto de una presentación multivalente en sus propiedades de inhibición. En colaboración con los grupos de los Profesores P. Compain y J.-F. Nierengarten (Univ. de Estrasburgo) se han preparado multiconjugados de DNJ o DMJ sobre plataformas de fullereno-[C₆₀] o β -ciclodextrina (β CD). Se han observado modificaciones significativas en el perfil de afinidad hacia diferentes enzimas que son función de la valencia y de la arquitectura tridimensional del sistema. El resultado más llamativo es el aumento de hasta cuatro órdenes de magnitud en la potencia de inhibición de la α -manosidasa (α -Manasa) de judía Jack, una enzima estructuralmente relacionada con las α -Manasas lisosomal y de Golgi humanas, para un conjugado tetradecavalente de DNJ- β CD. Estos estudios han conducido a formular la existencia de un *efecto inhibidor multivalente*.

En la Tesis también se aborda el desarrollo de nuevas metodologías de síntesis de iminoazúcares de la familia de las pirrolidinas y análogos de 2-acetamido-2-desoxiazúcares. Estos trabajos se han realizado en colaboración con los grupos de los

Profesores G. W. J. Fleet (Univ. Oxford) y A. Riera (Univ. Barcelona) y han permitido acceder a derivados de la serie L en el primer caso y a la primera síntesis de la 2-acetamido-2-desoxialonojirimicina (DAJNAc), un inhibidor potente de la β -glucosaminidasa (β -GlcNAcase) de placenta humana, en el segundo.

SUMMARY

Lysosomal Storage Disorders (LSDs), among which Gaucher disease (GD), Fabry disease (FD) and GM₁ gangliosidosis (GM1), are a group of genetic diseases affecting a low proportion of the world population. Most of them lack of efficient treatment nowadays. They are characterized by the dysfunction of any of the enzymes involved in the metabolism of glycosphingolipids in the lysosome. In many cases, the mutation at the origin of the disease implies a change in the amino acid sequence that prevents proper folding. Defective enzymes are derived to the proteasome by the quality control system of the endoplasmic reticulum and degraded. Consequently accumulation of the corresponding substrate occurs in the lysosome, resulting in a variety of severe pathologies. Parenteral administration of the corresponding recombinant enzyme has allowed improving life quality spectacularly in some cases, but this strategy is unsuitable when implications in the central nervous system occur. The design of molecules capable of inducing the correct folding of the enzyme, rescue it from degradation and promoting trafficking to the lysosome represents an alternative for those cases that has led to a new approach known as *pharmacological chaperone therapy*.

This Thesis represents a contribution to the development of pharmacological chaperones for GD, FD and GM1 based on glycomimetics with sp²-iminosugar structure. Compounds of this family behave as potent and selective inhibitors of glycosidases, including several human lysosomal glycosidases. At subinhibitory concentrations, they are able to bind the mutant enzyme at the endoplasmic reticulum, facilitating trafficking of the chaperone-enzyme complex to the Golgi apparatus for maturation and then to its final destination in the lysosome, where the excess of substrate displaces the chaperon and metabolic activity is restored. X-Ray diffraction data of sp²-iminosugar—glycosidase complexes and structure-activity relationship studies has allowed selecting good candidates as pharmacological chaperones that have been evaluated in human fibroblasts

from LSD patients, transfected COS cells expressing different mutations and in transgenic mice.

A first ensemble of the results obtained in the PhD Thesis Project are related to two new sp^2 -iminosugar families derived from 1-deoxynojirimycin (DNJ) and its *L-ido*-configured analogue (L-DIJ) with the ability of acting on enzymes involved in the biosynthesis and degradation of glucosylceramide, the accumulated glycosphingolipid in GD patients. In collaboration with Profs. J. M. F. G. Aerts (Univ. Amsterdam) and H S. Overkleeft (Univ. Leiden), the intralysosomal activity increase after chaperone administration has been determined by using fluorescently labelled activity probes. In both series of compounds we could identify candidates with strong potential for the treatment of GD-associated pathologies.

The central part of this Thesis focuses in the design of specific inhibitors of lysosomal α -galactosidase (α -Galase) and β -galactosidase (β -Galase) suitable as pharmacological chaperones for the treatment of FD and GM1, respectively. We have shown that the anomeric selectivity of sp^2 -iminosugars derived from 1-deoxygalactonojirimycin (DGJ) can be tailored acting on the structure of the heterocyclic skeleton: monocyclic derivatives behave as highly selective inhibitors of α -Galase whereas bicyclic derivatives are selective β -Galase inhibitors. This shift in anomeric selectivity is governed by hydrophobic non-glycone interactions, which at their turn depends on the orientation of the exocyclic substituent on the pseudoamide group. In collaboration with Profs. Y. Suzuki (Univ. Otawara), K. Ohno and K. Higaki (Univ. Tottori, Japón) we have evaluated the pharmacological chaperone potential of the new derivatives both *in vitro*, using human fibroblasts and transfected COS cells expressing FD or GM1 mutations, and *in vivo* in genetically modified mice. The results demonstrate the ability of the chaperones to cross the blood-brain barrier and reduce glycosphingolipid accumulation in the brain, thereby reverting the disease at least at the level of neuronal tissue.

An efficient pharmacological chaperone must bind the target enzyme tightly at the endoplasmic reticulum (pH 7.3) but dissociate in the lysosome (pH 5.2). Keeping that in mind, we have explored the incorporation of a pH-sensitive orthoester function in the design of a new generation of sp²-iminosugars derived from DNJ and DGJ. The orthoester group connects the iminosugar core to the hydrophobic substituent, so that hydrolysis at pH \leq 5.5 leads to an important loss of binding affinity. This concept has been applied to the preparation of pharmacological chaperones for GD and FD.

Our interest in new approaches directed to modulate potency and selectivity of iminosugars as glycosidase inhibitors for therapeutic purposes, led us to explore the effect of a multivalent presentation in their inhibitory properties. In collaboration with Profs. P. Compain and J.-F. Nierengarten (Univ. Strasbourg), a series of DNJ or DMJ multiconjugates centered on fullerene-[C₆₀] or β -cyclodextrin (β CD) scaffolds have been prepared. Significant alterations in the glycosidase affinity profile have been observed as a function of the valency and tridimensional architecture of these systems. The most spectacular result is up to four orders of magnitude increase in the inhibition potency towards Jack bean α -mannosidase (α -Manase), an enzyme structurally related to human lysosomal and Golgi α -Manases. Those studies let us formulate the concept of *multivalent inhibitory effect*.

Finally, the Thesis also collects our results on the development of new methodologies for the synthesis of pyrrolidine iminosugars and 2-acetamido-2-deoxysugar analogues. These subjects, developed in collaboration with Profs. G. W. J. Fleet (Univ. Oxford) and A. Riera (Univ. Barcelona), allowed accessing L-glycomimetics in the first case and preparing 2-acetamido-2-deoxyallonojirimycin (DAJNAc), a potent inhibitor of human placenta β -glucosaminidase (β -GlcNAcase), in the second case.

Capítulo 1

Introducción General

1. Introducción general.

1.1. El lisosoma.

Los lisosomas son orgánulos esféricos de membrana simple, situados en el citoplasma, en cuyo interior se encuentran enzimas hidrolíticas que llevan a cabo la degradación de distintos tipos de macromoléculas producidas por el catabolismo celular. Estos orgánulos fueron descubiertos por Christian de Duve *et al.*¹ en 1955, se encuentran en la mayoría de células eucariotas, presentan gran diversidad en cuanto al tamaño (0.05-0.5 μm) y se caracterizan por su pH ácido (pH 5.5) (Figura 1.1). Las enzimas lisosomales son glicoproteínas que se sintetizan en los pliegues del retículo endoplásmico (RE) rugoso, donde son *N*-glicosidadas antes de ser transportadas al aparato de Golgi y finalmente al lisosoma, donde realizan su función catalítica.

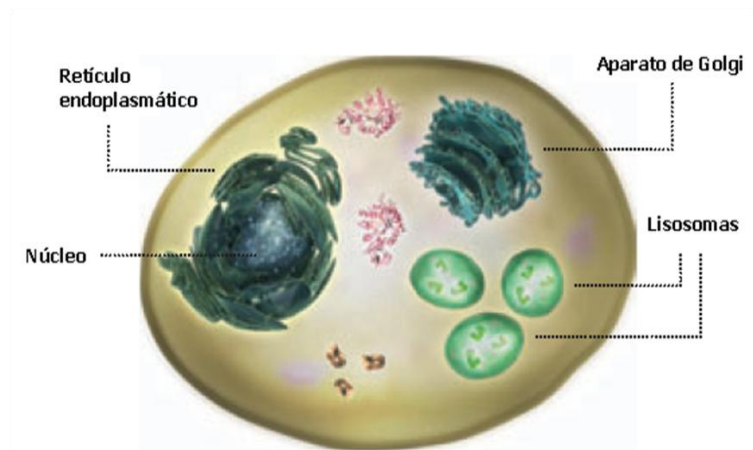


Figura 1.1. Anatomía del interior celular. La glicosidación masiva de la cara interna de la membrana que protege al lisosoma evita la autodigestión de estos orgánulos.

1.2. Enfermedades de almacenamiento lisosomal.

Las enfermedades de almacenamiento lisosomal (*Lysosomal Storage Disorders*, LSDs) son un grupo de errores innatos del metabolismo que afectan al correcto

funcionamiento de alguna de las enzimas lisosomales. La primera descripción de una LSD se remonta a 1881 por Tay Sachs,² habiéndose caracterizado actualmente más de 50 desórdenes diferentes de este tipo (Tabla 1.1). La deficiencia parcial o completa de la actividad de la enzima lisosomal afectada lleva a la acumulación progresiva de los correspondientes sustratos no degradados en los distintos órganos y tejidos afectados, ocasionando su disfunción. Aunque cada una de las LSDs de manera individual tiene baja frecuencia, como grupo presentan una incidencia estimada de 1 en 1.500 a 7.000 nacidos vivos³ (Figura 1.2). Se trata de un grupo extenso de enfermedades de carácter genético con patrón de herencia autosómico recesivo, excepto para las enfermedades de Fabry y de Hunter en las que el patrón de herencia está ligado al cromosoma X. En general, estas enfermedades afectan a múltiples órganos con distinto grado de severidad, las manifestaciones clínicas son variables y muchas de ellas son de carácter progresivo e irreversible, por lo que normalmente la esperanza de vida en los pacientes afectados es reducida.

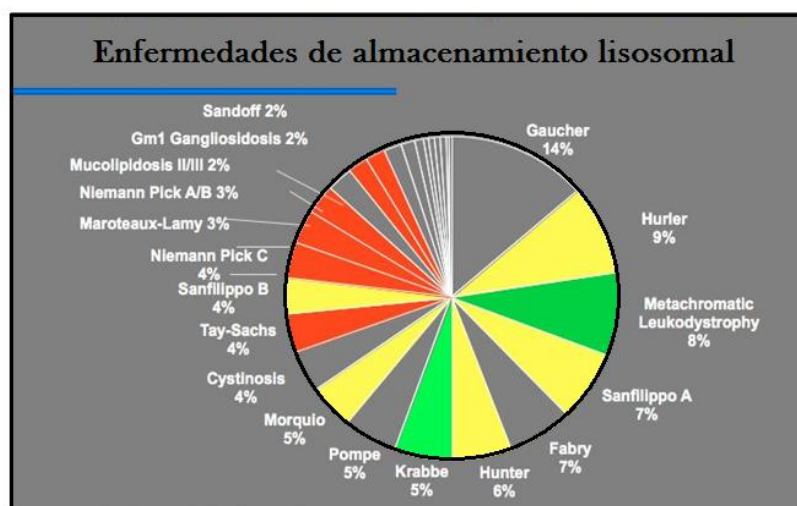


Figura 1.2. Prevalencia de las enfermedades de almacenamiento lisosomal .

Tabla 1.1. Clasificación de algunas de las LSDs de mayor prevalencia.⁴

DESORDEN	DEFICIENCIA ENZIMÁTICA	MATERIAL ACUMULADO
Depósito de lípidos (esfingolipidosis)		
Fabry	α -Galactosidasa A	Globotriaosilceramida
Gaucher	β -Glucosidasa ácida	Glucosilceramida
Niemann-Pick	Esfingomielinasa	Esfingomielina
Gangliosidosis GM ₁	β -Galactosidasa	Gangliósido GM ₁
Enfermedad de Tay-Sachs	β -Hexosaminidasa A	Gangliósido GM ₂
Enfermedad de Sandhoff	β -Hexosaminidasa A y B	Gangliósido GM ₂
Depósito de glucógeno (glucogenosis)		
Enfermedad de Pompe	α -Glucosidasa ácida	Glucógeno
Depósito de glicoproteínas (glicoproteinosis)		
α -Manosidosis	α -Manosidasa	Oligosacáridos
β -Manosidosis	β -Manosidasa	Oligosacáridos
Fucosidosis	α -Fucosidasa	Glicopéptidos, oligosacáridos
Sialidosis	Neuraminidasa	Sialiloligosacáridos
Depósito de mucopolisacáridos (mucopolisaridosis, MPS)		
MPS I (Hurler)	α -Iduronidasa	Dermatán sulfato y heparán sulfato
MPS II (Hunter)	Iduronato-2-sulfatasa	Dermatán sulfato y heparán sulfato
MPS III (Sanfilippo A, B, C y D)	N-Acetil- α -glucosaminidasa	Heparán sulfato
MPS IV (Morquio A y B)	β -Galactosidasa	Heparán sulfato
MPS VI (Maroteaux-Lamy)	Arilsulfatasa B	Dermatán sulfato
MPS VII (Sly)	β -Glucuronidasa	Dermatán sulfato y heparán sulfato

En esta Tesis nos centraremos principalmente en el estudio de las enfermedades de Gaucher, Fabry y gangliosidosis GM₁.

La **enfermedad de Gaucher** (*Gaucher Disease*, GD) fue descrita por primera vez en 1882 por el médico francés Philippe Charles Ernest Gaucher⁵ y es la LSD de mayor prevalencia, con una incidencia de aproximadamente 40.000-60.000 personas en el mundo.⁶ En España hay un total de 343 pacientes afectados por GD y 1.400 portadores de la enfermedad.⁷ La comunidad autónoma con mayor número de pacientes afectados por esta enfermedad es Andalucía, que registra el 21.5% del total de pacientes.⁷ Es originada por un déficit de la actividad parcial o total de la β -glucosidasa ácida (β -glucocerebrosidasa, GlcCasa o GBA1) que conlleva el acúmulo intralisosomal de glucosilceramida (GlcCer). Estos depósitos grasos se localizan primordialmente en el hígado, bazo, médula ósea y, en menor frecuencia, en el cerebro. La GD se puede clasificar en tres tipos clínicos diferentes:⁸

Tipo 1 (no neuronopática). Es la forma más común y afecta a 1 de cada 40.000 a 60.000 niños nacidos vivos. Este tipo no afecta al sistema nervioso central y es la más común entre los judíos de ascendencia Ashkenazi (Europa Oriental) con una incidencia de 1 de cada 450 personas nacidas vivas en este grupo.

Tipo 2 (neuronopática aguda). GD Tipo 2 presenta una incidencia menor y afecta a menos de 1 en 100.000 niños nacidos vivos. Los pacientes afectados por GD Tipo 2 sufren efectos más severos que las del Tipo 1 incluyendo problemas neurológicos, por lo que algunos de ellos no superan los 2 años de edad.

Tipo 3 (neuronopática crónica). El Tipo 3 también afecta a menos de 1 en 100.000 niños nacidos vivos. Los síntomas son menos severos que los del Tipo 2 y suelen aparecer durante la infancia o niñez, por lo que los pacientes por GD Tipo 3 pueden alcanzar la edad adulta.

La **enfermedad de Fabry** (*Fabry Disease*, FD) fue descrita por primera vez de forma independiente en 1898 por los dermatólogos Johannes Fabry (Alemania) y William Anderson (Inglaterra) y es el segundo desorden más frecuente de depósito de glicosfingolípidos después de GD. Afecta más a los hombres que a las mujeres y presenta una incidencia de 1 en cada 40.000 hombres, mientras que la prevalencia en la población general es de 1 en 117.000 personas.⁹ Actualmente, se ha diagnosticado FD a 5.000-10.000 pacientes a nivel mundial. Se caracteriza por un déficit en la actividad de la α -galactosidasa ácida (α -Gal A), lo cual origina la acumulación del sustrato globotriosilceramida en los lisosomas de los órganos afectados, principalmente corazón, sistema nervioso, sistema digestivo, riñones y piel. Las distintas mutaciones causantes de FD forman un grupo muy heterogéneo. Se han descrito más de 600 mutaciones diferentes, de las cuales ninguna presenta mayor prevalencia sobre las demás.

La **gangliosidosis GM₁** fue descrita en 1965 por O'Brien¹⁰ y presenta una incidencia de 1 de cada 100.000-200.000 nacidos vivos.¹¹ Está causada por una deficiencia en la actividad de β -galactosidasa (β -Gal) lisosomal, originando el acúmulo del gangliósido GM₁ principalmente en el sistema nervioso central. Hay tres subtipos clínicos clasificados en función de la edad de manifestación (infantil, juvenil y adulto) que se diferencian en la severidad de los síntomas. Las mutaciones más frecuentes son: I51T (adultos) y R201C (juvenil) en Japón, R482H (infantil) en Italia y R208C en América (infantil).¹² Los pacientes no disponen actualmente de tratamiento específico que prevenga la aparición de síntomas o detenga el curso de la enfermedad.

En la Figura 1.3 se muestra la distribución de GD, FD y gangliosidosis GM₁ a nivel mundial:



Figura 1.3. Distribución global de las enfermedades de almacenamiento lisosomal. En el mapa se representan los países donde hay mayor número de pacientes afectados por GD (amarillo), FD (azul) y gangliosidosis GM₁ (rojo).

Hasta la década de los 90, la única aproximación terapéutica para el tratamiento de las LSDs era la extirpación del órgano afectado, siempre que ese órgano no fuera vital, o bien el trasplante de dicho órgano cuando fuera posible. En las últimas tres décadas, se han realizado importantes avances en el tratamiento de este grupo de enfermedades, centrados en conseguir corregir la deficiencia enzimática o bien disminuir los niveles de la biosíntesis del correspondiente sustrato acumulado (Figura 1.4). A continuación, se describen algunas aproximaciones terapéuticas disponibles o bajo investigación para las LSDs:



Figura 1.4. Clasificación de las terapias para las LSDs.

Terapia de reemplazamiento enzimático (*Enzyme Replacement Therapy, ERT*). Consiste en la infusión intravenosa de la correspondiente enzima recombinante con objeto de suplir las funciones de la enzima deficiente. Esta terapia se aplicó por primera vez en 1991 y actualmente es una aproximación terapéutica para el tratamiento de GD (Cerezyme®, Velaglucerasa α , Taliglucerasa α)¹³ y FD (Replagal®),¹⁴ aunque no es útil para la gangliosidosis GM₁. Esta terapia presenta una eficacia a largo plazo documentada en miles de pacientes tratados. En cambio, presenta como principales inconvenientes la mala biodistribución de la enzima recombinante junto a la incapacidad de la enzima por atravesar la barrera hematoencefálica, la desnaturalización de la enzima en la sangre antes de alcanzar el lisosoma, la frecuencia de las infusiones que implica un impacto elevado en la calidad de vida del paciente y el elevado coste en la obtención de la enzima recombinante.¹⁵

Terapia de reducción de sustrato (*Substrate Reduction Therapy, SRT*). Consiste en la administración oral de un inhibidor de la enzima que lleva a cabo la biosíntesis del sustrato acumulado y se aplicó por primera vez en 2003 en pacientes afectados por GD. El derivado *N*-butildesoxinojirimicina (Zavesca® o Miglustat) se comporta como un inhibidor de la β -glucosilceramida sintasa (GCS) y, por tanto, reduce

su biosíntesis (Figura 1.5). Presenta como ventaja fundamental la administración oral y, por tanto, un impacto bajo en la calidad de vida del paciente. Las principales limitaciones de esta terapia son la experiencia clínica limitada (excepto para Gaucher) y el desconocimiento de los efectos secundarios a largo plazo.¹⁵ Actualmente, se está desarrollando otro inhibidor de GCS para su uso en SRT, Eliglustat,¹⁶ que no tiene naturaleza glicomimética y se encuentra en fase clínica III (Figura 1.5). Esta aproximación terapéutica se encuentra bajo desarrollo para FD y la gangliosidosis GM₁.

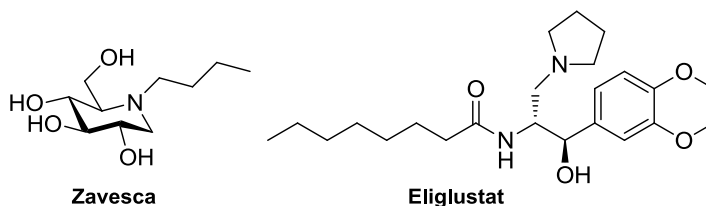


Figura 1.5. Estructuras de Zavesca y Eliglustat.

Terapia génica. Consiste en el uso de un vector viral no patógeno para transportar el gen que codifica la enzima deficiente y liberarlo en el interior celular. La principal dificultad de esta terapia, actualmente en estudio para el tratamiento de las LSDs, reside en conseguir los niveles adecuados de expresión del material genético exógeno así como regular la expresión del mismo y mantenerla constante en el tiempo.

Terapia de chaperonas farmacológicas (*Pharmacological Chaperone Therapy, PCT*). Consiste en la administración oral de un compuesto, denominado chaperona farmacológica (*Pharmacological Chaperone, PC*), capaz de incrementar la actividad residual de la enzima mutante en el lisosoma. Muchas de las mutaciones en la secuencia de aminoácidos de la enzima lisosomal que están en el origen de una LSD provocan que ésta no se pliegue correctamente y, si las chaperonas moleculares del RE no son capaces de restaurar la conformación nativa de la enzima, éstas no superan el control de calidad del RE y son degradadas por el proteosoma. Las PCs sirven de molde, favorecen el

plegamiento correcto de la enzima mutante y ayudan al mantenimiento de la conformación nativa de la misma, facilitando el tráfico hasta los lisosomas (Figura 1.6).

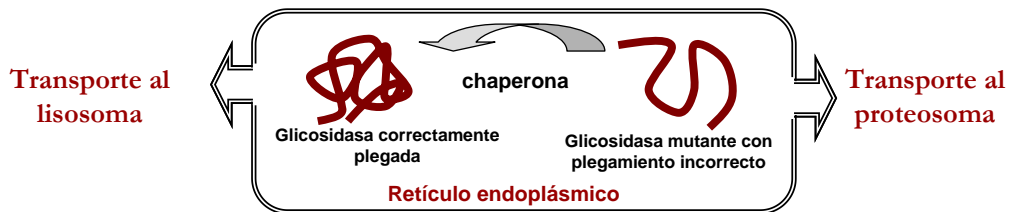


Figura 1.6. Representación esquemática de la estrategia de PCT para el tratamiento de LSDs.

La mayor parte de las PCs descritas son moléculas pequeñas, lo que favorece el acceso al interior celular. Idealmente, deberían unirse a la enzima mutante con especificidad y afinidad elevadas en el RE (pH neutro) y liberarse en presencia de una alta concentración de sustrato una vez que el complejo enzima-chaperona alcanza el lisosoma (pH ácido). La alta especificidad de una chaperona por una enzima concreta minimizaría las posibles interacciones con otras proteínas de la célula, maximizando así el efecto del fármaco. Actualmente, es una terapia que se encuentra bajo investigación y que presenta como principales ventajas una mejor biodistribución que la enzima recombinante, la posibilidad de atravesar la barrera hematoencefálica, la administración oral y, por tanto, un pequeño impacto en la calidad de vida de los pacientes.¹⁵ Por el contrario, presenta como inconvenientes el desconocimiento de los posibles efectos secundarios a largo plazo, la limitada experiencia clínica y la respuesta positiva únicamente frente a un número limitado de mutaciones.

Recientemente, la empresa farmacéutica *Amicus Therapeutics* ha iniciado el estudio de la combinación de más de una terapia como alternativa para el tratamiento de las LSDs. Estudios preclínicos sugieren que la administración de una PC co-administrada o co-formulada con una enzima recombinante (ERT) es una aproximación ventajosa para el tratamiento de estos desórdenes.¹⁷ Estudios *in vivo* con modelos animales de GD y FD han puesto de manifiesto que la co-administración de las PCs y la enzima permite la

unión selectiva y la estabilización de la enzima exógena, previniendo la desnaturalización de la misma en la sangre e incrementando considerablemente la actividad enzimática residual en los tejidos afectados en comparación con ERT como monoterapia. La combinación de ambas aproximaciones debería beneficiar a los pacientes que actualmente se encuentran bajo tratamiento de ERT, incluyendo aquellos pacientes para los que la monoterapia de PC no resulta efectiva (Figura 1.7).



Figura 1.7. Comparación de las ventajas de la PCT utilizada como monoterapia y combinada con ERT.

1.3. Iminoazúcares como chaperonas farmacológicas.

Hemos visto en el apartado anterior que el diseño de chaperonas dirigidas al sitio activo de la enzima y su aplicación en PCT es una estrategia terapéutica emergente que usa moléculas pequeñas, capaces de unirse a la enzima defectuosa, como fármacos para el tratamiento de LSDs.¹⁸ Aunque dichas chaperonas no comparten una estructura básica definida,¹³ la mayoría de los derivados que se encuentran bajo estudio como candidatos a PCs son glicomiméticos de tipo iminoazúcar. Los iminoazúcares son análogos de

monosacáridos en los que el átomo de oxígeno endocíclico ha sido reemplazado por un átomo de nitrógeno. Estos derivados se comportan como inhibidores de glicosidasas debido al parecido estructural de estas moléculas con las unidades monosacáridicas de los sustratos naturales de las enzimas y de su capacidad de mimetizar el catión oxacarbenio, un intermedio clave en la reacción de hidrólisis del enlace glicosídico, en su estado protonado. La elevada afinidad que presentan los iminoazúcares por las glicosidasas es debido a que son protonados en el medio biológico e interaccionan fuertemente con los grupos aniónicos del sitio activo de la enzima (Figura 1.8).

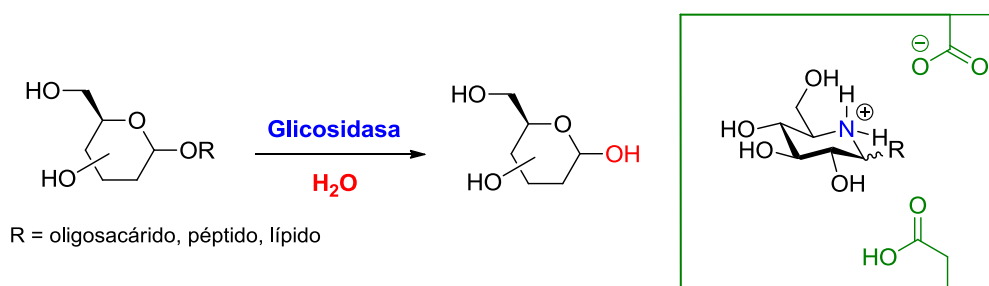


Figura 1.8. Hidrólisis enzimática del enlace glicosídico.

Esta simple sustitución de oxígeno por nitrógeno plantea muchos retos sintéticos y abre una nueva línea de investigación en el terreno del estudio de las propiedades biológicas. Como tal, los iminoazúcares forman sin duda la clase más atractiva de glicomiméticos hasta el momento, fomentando un ritmo de síntesis en este campo que, durante la última década, ha sido impresionante. El comportamiento de los iminoazúcares como inhibidores de glicosidasas preconiza un gran potencial para el desarrollo de fármacos frente a un elevado número de desórdenes, entre los que se encuentran las LSDs.¹⁹ Atendiendo al tipo y tamaño del anillo, los iminoazúcares se pueden clasificar en las siguientes familias:²⁰ a) pirrolidinas, b) piperidinas, c) azepanos, d) nortropanos, e) pirrolizidinas y f) indolizidinas (Figura 1.9).

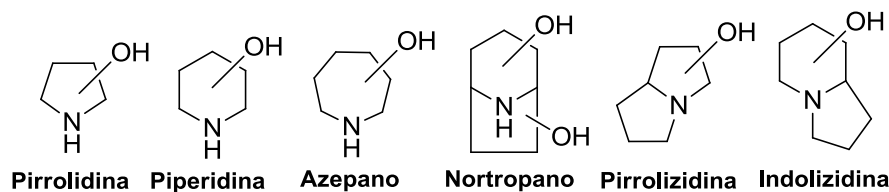


Figura 1.9. Estructuras generales de los iminoazúcares naturales.

El concepto de PC como terapia para el tratamiento de las LSDs se introdujo por primera vez con el iminoazúcar 1-desoxigalactonojirimicina (DGJ·HCl, Migalastat) para el tratamiento de FD.²¹ Este derivado se comporta como un inhibidor competitivo, potente y reversible de α -Gal A (IC_{50} 4.7 nM) y actualmente es el derivado que ha llegado más lejos en la evaluación como chaperona para el tratamiento de una LSD, encontrándose en fase clínica III para el tratamiento de FD.²² La 1-desoxinojirimicina (DNJ·HCl, Duvoglustat) es también un conocido glicomimético que presenta actividad biológica como inhibidor de α -glucosidasa ácida, encontrándose actualmente en fase clínica II como candidato a PC para la enfermedad de Pompe.²³ Por otra parte, la isofagomina (IFG) es un iminoazúcar que se comporta como inhibidor de GlcCasa y que se encuentra bajo investigación como PC para GD en fase preclínica.²⁴ Otro ejemplo lo constituye la *N*-octil-4-*epi*- β -valienamina (NOEV), que se comporta como inhibidor de β -Gal ácida, encontrándose en fase preclínica para su posible uso como PC en el tratamiento de la gangliosidosis GM₁ (Figura 1.10 y Tabla 1.2).

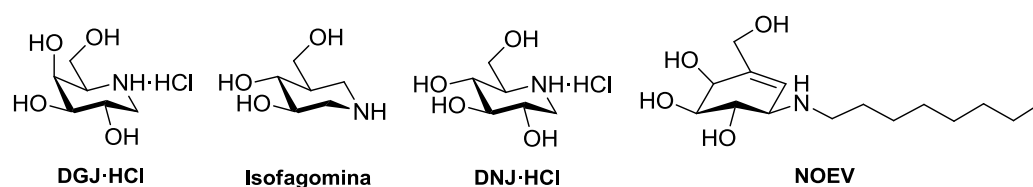


Figura 1.10. Estructuras de algunos derivados bajo estudio como PCs.

Tabla 1.2. Resumen de los derivados más destacados bajo estudio como PCs.

Desorden	Deficiencia enzimática	Material acumulado	Chaperona de referencia	Estado
Fabry	α -Gal A	Globotriaosilceramida	Migalastat, DGJ·HCl	Fase III
Gaucher	GlcCasa	GlcCer	Isofagomina	Preclínica
Pompe	α -glucosidasa ácida	Glucógeno	Duvoglostat, DNJ·HCl	Fase I
Gangliosidosis GM ₁	β -Gal ácida	Gangliósido GM ₁	NOEV	Preclínica

A pesar de las expectativas y de los ensayos clínicos realizados o en curso, el número de fármacos basados en glicomiméticos en el mercado continúa siendo escaso. La razón principal es la falta de selectividad de la mayoría de los candidatos estudiados. El diseño de inhibidores altamente potentes y selectivos se presenta aún como un reto. Frecuentemente, los iminoazúcares clásicos inhiben simultáneamente a varias α - y β -glicosidasas, lo que puede atribuirse a que normalmente carecen de una configuración definida en el centro pseudoanomérico y representa un problema serio para sus aplicaciones clínicas. En la búsqueda de inhibidores específicos de glicosidasas, el grupo de investigación en el que se ha desarrollado esta Tesis ha descrito que un cambio sutil en la estructura de los iminoazúcares, consistente en la sustitución del nitrógeno imínico sp^3 por un átomo de nitrógeno de tipo pseudoamida, por tanto con elevado carácter sp^2 , conduce a inhibidores de glicosidasas con alta selectividad anomérica y que exhiben estabilidad conformacional y configuracional en medio acuoso, incluso para derivados con funcionalidades típicamente inestables como los grupos hemiaminal o gem-diamina. Este tipo de compuestos constituyen una nueva familia de glicomiméticos denominada “**iminoazúcares sp^2** ”. Las estrategias de síntesis desarrolladas para su preparación están típicamente orientadas a facilitar la introducción de diversidad molecular, permitiendo realizar modificaciones estructurales de manera controlada y con un coste sintético bajo. En el contexto de esta temática, la presente Tesis se ha enfocado en el desarrollo de

inhibidores de glicosidasas selectivos y eficaces como PCs para el tratamiento de LSDs, en concreto de GD, FD y la gangliosidosis GM₁, incluyendo el análisis de la influencia de la naturaleza de la función pseudoamida, de los sustituyentes exocíclicos y del perfil configuracional de los grupos hidroxilos frente a una colección de glicosidasas comerciales y humanas.

1.4. Iminoazúcares multivalentes.

La naturaleza hace un uso extensivo de las interacciones multivalentes para incrementar la afinidad entre dos entidades biológicas complementarias, lo que en general implica uniones simultáneas de múltiples ligandos de una entidad biológica a múltiples receptores de otra entidad.²⁵ Entre los ejemplos de interacciones multivalentes se encuentran la unión de anticuerpos a patógenos o la fijación de virus a células diana. La principal ventaja de las interacciones multivalentes es que provocan un aumento de afinidad mucho mayor que el efecto que produciría la suma de las correspondientes interacciones monovalentes. Por ello, existe un gran interés en el uso de esta estrategia para diseñar derivados que puedan participar en interacciones biológicas, por ejemplo para inhibir la acción de virus²⁶ y bacterias²⁷ y promover así las respuestas celulares deseadas.

En los últimos años, el concepto de la multivalencia ha sido ampliamente explotado en el terreno de la glicobiología para generar glicoligandos capaces de incrementar y modular la afinidad hacia un receptor dado. En la bibliografía podemos encontrar ejemplos de síntesis de inhibidores multivalentes, que son varios órdenes de magnitud más potentes que sus correspondientes ligandos monovalentes.²⁸ Por ejemplo, Whitesides *et al.* diseñaron una serie de polímeros con múltiples unidades de ácido siálico que presentaban una potencia 10⁹ veces mayor que la del ácido siálico por la lectina hemaglutinina y que eran capaces de bloquear la adhesión del virus de la gripe a partículas de eritrocitos.²⁹ Pese a que las interacciones multivalentes de glicoligandos con lectinas

han sido muy estudiadas,³⁰ la posibilidad de implementar el concepto de multivalencia para controlar las interacciones entre glicosilhidrolasas y los correspondientes glicomiméticos ha sido prácticamente inexplorada, con sólo unos pocos ejemplos de iminoazúcares multivalentes descritos en la literatura. Recientemente, en un trabajo desarrollado en colaboración entre nuestro grupo y los grupos de S. Gouin y J. Kovensky³¹ se sintetizó un iminoazúcar trivalente funcionalizado con DNJ (**DNJ₃**) con el objetivo inicial de aumentar la inhibición frente a enzimas con actividad α -glucosidasa (Figura 1.11). Sorprendentemente, tras la evaluación biológica frente a diversas glicosidasas comerciales, se observó que dicho derivado no mostraba capacidad de inhibición frente a α -glucosidasas, pero a cambio presentó una alta afinidad frente a la α -manosidasa de judía Jack (2 veces por unidad de DNJ), pese a tratarse de un sistema funcionalizado con un iminoazúcar de configuración D-*gluco*. Este resultado parece indicar que la multivalencia, más que únicamente incrementar la afinidad de un inhibidor frente a una enzima, es capaz de modificar su selectividad de acción.

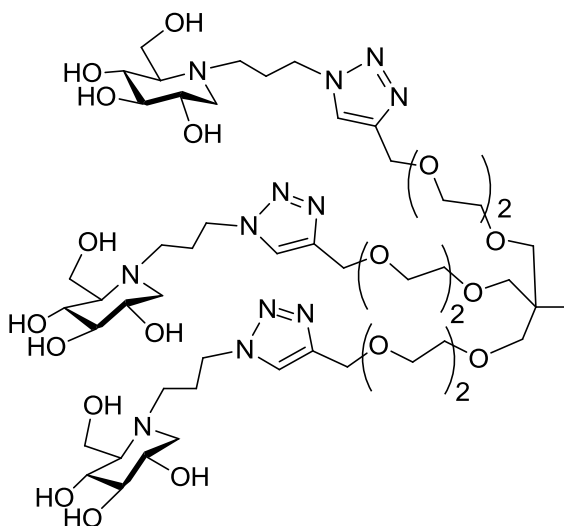


Figura 1.11. Estructura del derivado trivalente (**DNJ₃**).

El resultado anterior abre muchos interrogantes sobre la relevancia de la

multivalencia en relación con la inhibición de glicosidasas, incluyendo la importancia de los efectos estructurales, los límites de incrementos de potencia que pueden alcanzarse, la naturaleza de las enzimas susceptibles de responder a la presentación multivalente de un determinado motivo inhibidor o los diferentes mecanismos que pueden operar. Para profundizar en este tema, se ha iniciado una colaboración con los Prof. P. Compain y J.-F. Nierengarten, de la Universidad de Estrasburgo. La idea de partida es la utilización de dos plataformas multitópicas especialmente bien adaptadas para generar multivalencia, el fullereno [C₆₀] y la β -ciclodextrina (β -CD), y preparar una serie de clústeres de iminoazúcares de valencia elevada con objeto de explorar los efectos estructurales sobre la inhibición de glicosidasas. Para garantizar la homogeneidad de los conjugados objetivos, se utilizará la reacción de cicloadición azida-alquino catalizada por cobre (I) (CuAAC) para la etapa de multiconjugación.

¹ C. De Duve, R. Wattiaux, *Annu. Rev. Physiol.* **1966**, 28, 435-492.

² S. Hindle, S. Hebbar, S. T. Sweeney, *Invert. Neurosci.* **2011**, 11, 59-71.

³ O. Staretz-Chacham, T. C. Lang, M. E. LaMarca, D. Krasnewich, E. Sidransky, *Pediatrics* **2009**, 123, 1191-1207.

⁴ *Harrison's Principles of Internal Medicine* (Eds.: A. S. Fauci, D. L. Kasper, D. L. Longo, E. Braunwald, S. L. Hauser, J. L. Jamenson, J. Loscalzo), McGraw-Hill, USA, **2008**; p. 2452-2456.

⁵ A. Mehta, *Eur. J. Intern. Med.* **2006**, 17, S2-S5.

⁶ O. Motabar, E. Goldin, W. Leister, K. Liu, N. Southall, W. Huang, J. J. Marugan, E. Sidransky, W. Zheng, *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, 402, 731-739.

⁷ Registro Español de la Enfermedad de Gaucher <http://www.feeteg.org/registro.php> (última consulta 14/05/2013).

⁸ www.genzyme.es/areas-tratamiento/gaucher.aspx (última consulta 14/05/2013).

-
- ⁹ <http://www.shireiberica.com/shire-espana/enfermedad-de-fabry.aspx> (última consulta 14/05/2013).
- ¹⁰ S. Huiping, L. Huiyuan, Z. Shiming, *Proceedings of the Chinese Academy of Medical Sciences and the Pekin Union Medical College* **1986**, *1*, 114-115.
- ¹¹ Y. Suzuki, *Brain Dev.* **2013**, *35*, 515-523.
- ¹² T. Takai, K. Higaki, M. Aguilar-Moncayo, T. Mena-Barragán, Y. Hirano, K. Yura, L. Yu, H. Ninomiya, M. I. García-Moreno, Y. Sakakibara, K. Ohno, E. Nanba, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, Y. Suzuki, *Mol. Ther.* **2013**, *21*, 526-532.
- ¹³ J. M. Benito, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, *Expert Opin. Ther. Patents* **2011**, *21*, 885-903.
- ¹⁴ <http://www.shire.com/shireplc/en/products/rare/fabrydisease/REPLAGAL>
- ¹⁵ G. Parenti, *EMBO Mol. Med.* **2009**, *1*, 268-279.
- ¹⁶ <http://news.genzyme.com/press-release/genzyme-announces-positive-new-data-two-phase-3-studies-oral-eliglustat-tartrate-gauch> (última consulta: 22/08/2013).
- ¹⁷ a) R. Khanna, J. J. Flanagan, J. Feng, R. Soska, M. Frascella, L. J. Pellegrino, Y. Lun, D. Guillen, D. J. Lockhart, K. J. Valenzano, *PLoS ONE* **2012**, *7*, e40776; b) E. R. Benjamin, R. Khanna, A. Schilling, J. J. Flanagan, L. J. Pellegrino, N. Brignol, Y. Lun, D. Guillen, B. E. Ranes, M. Frascella, R. Soska, J. Feng, L. Dungan, B. Young, D. J. Lockhart, K. J. Valenzano, *Mol. Ther.* **2012**, *20*, 717-726.
- ¹⁸ Iminosugars: From Synthesis to Therapeutic Applications (Eds.: P. Compain, O. R. Martin), Wiley, New York, **2007**.
- ¹⁹ a) V. H. Lillelund, H. H. Jensen, X. Liang, M. Bols, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 515-553; b) N. Asano, *Glycobiology* **2003**, *13*, 93R-104R; c) T. M. Gloster, G. J. Davies, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 305-320; d) T. D. Heightman, A. T. Vasella, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 794-815; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 750-770; e) B. P. Rempel, S. G. Withers, *Glycobiology* **2008**, *18*, 570-586; f) T. Kajimoto, M. Node, *Curr. Top. Med. Chem.* **2009**, *9*, 13-33.

-
- ²⁰ G. Horne, F. X. Wilson, J. Tinsley, D. H. Williams, R. Storer, *Drug Discov. Today* **2011**, *16*, 107-118.
- ²¹ J. -Q. Fan, S. Ishii, N. Asano, Y. Suzuki, *Nat. Med.* **1999**, *5*, 112-115.
- ²² a) <http://www.amicusrx.com/programs.aspx> (última consulta: 30/05/2013); b) B. Young-Gqamana, N. Brignol, H.-H. Chang, R. Khanna, R. Soska, M. Fuller, S. A. Sitaraman, D. P. Germain, R. Giugliani, D. A. Hughes, A. Mehta, K. Nicholls, P. Boudes, D. J. Lockhart, K. J. Valenzano, E. R. Benjamin, *PLoS ONE* **2013**, *8*, e57631.
- ²³ <http://www.amicusrx.com/pompe.aspx> (última consulta: 30/05/2013).
- ²⁴ R. E. Boyd, G. Lee, P. Rybczynski, E. R. Benjamin, R. Khanna, B. A. Wustman, K. J. Valenzano, *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 2705-2725.
- ²⁵ M. Mammen, S.-K. Choi, G. M. Whitesides, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2754-2794.
- ²⁶ a) T. Honda, S. Yoshida, M. Arai, T. Masuda, M. Yamashita, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12*, 1929-1932; b) H. Kamitakahara, T. Suzuki, N. Nishigori, Y. Suzuki, O. Kanie, C.-H. Wong, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 1524-1528; c) M. Mammen, G. Dahmann, G. M. Whitesides, *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 4179-4190; d) M. N. Matrosovich, L. V. Mochalova, V. P. Marinina, N. E. Byramova, N. V. Bovin, *FEBS Lett.* **1990**, *272*, 209-212; e) G. B. Sigal, M. Mammen, G. Dahmann, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 3789; f) W. Spevak, J. O. Nagy, D. H. Charych, M. E. Schaefer, J. H. Gilbert, M. D. Bednarski, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 1146.
- ²⁷ a) E. Fan, Z. Zhang, W. E. Minke, Z. Hou, C. L. M. J. Verlinde, W. G. J. Hol, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2663; b) J. M. Gargano, T. Ngo, J. Y. Kim, D. W. K. Acheson, W. J. Lees, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 12909-12910; c) P. I. Kitov, J. M. Sadowska, G. Mulvey, G. D. Armstrong, H. Ling, N. S. Pannu, R. J. Read, D. R. Bundle, *Nature* **2000**, *403*, 669-672.
- ²⁸ V. M. Krishnamurthy, L. A. Estroff, G. M. Whitesides, *Fragment-based approaches in drug discovery*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., **2006**. p. 11-54.

²⁹ M. Mammen, K. Helmersson, R. Kishore, S.-K. Choi, W. D. Phillips, G. M. Whitesides, *Chem. Biol.* **1996**, *3*, 757-763.

³⁰ Y. M. Chabre, R. Roy, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **2010**, *63*, 165-393.

³¹ J. Diot, M. I. García-Moreno, S. G. Guin, C. Ortiz Mellet, K. Haupt, J. Kovensky, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 357-363.

Capítulo 2

Objetivos

2. Objetivos.

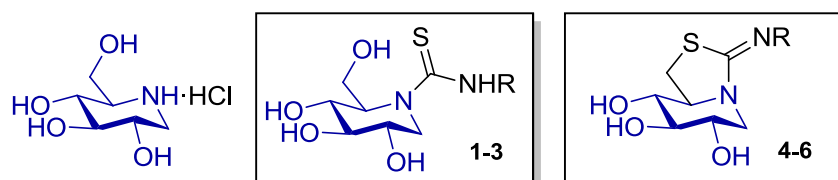
El objetivo principal de esta Tesis es identificar y caracterizar diversas familias de glicomiméticos de tipo iminoazúcar para su uso en diferentes terapias de las LSDs, con especial atención a GD, FD y gangliosidosis GM₁. Los objetivos concretos son:

- Realizar estudios de estructura-actividad dirigidos a determinar los requerimientos moleculares óptimos en iminoazúcares sp² para su uso como chaperonas farmacológicas.
- En base a los datos estructurales disponibles, diseñar nuevos candidatos como chaperonas farmacológicas basados en el control de la orientación de sustituyentes aglicónicos sobre iminoazúcares sp² y sus interacciones con aminoácidos vecinos al sitio activo.
- Evaluar los nuevos compuestos preparados tanto en células de pacientes de LSDs o en células COS que expresen la correspondiente glicosidasa mutante como, cuando sea posible, *in vivo* en modelos animales, con objeto de establecer el perfil de actividad mutacional.
- Identificar candidatos activos en mutaciones asociadas a variantes neuronopáticas de GD y gangliosidosis GM₁ capaces de atravesar la barrera hematoencefálica.
- Diseñar chaperonas farmacológicas basadas en iminoazúcares sp² sensibles al pH para su disociación programada en el lisosoma.
- Funcionalización de las plataformas de fullereno-[C₆₀] y βCD con múltiples copias de iminoazúcares a fin de profundizar en el estudio sobre el efecto inhibidor multivalente en el terreno de la inhibición de glicosidasas.
- En el marco de una estancia breve en el grupo de investigación del Prof. G. W. J. Fleet de la Universidad de Oxford, sintetizar una serie de pirrolidinas polihidroxiladas como inhibidores de glicosidasas.

- En el marco de una colaboración con el Prof. A. Riera (Universidad de Barcelona), desarrollo de una nueva metodología de síntesis para acceder a iminoazúcares miméticos de 2 acetamido-2 desoxiazúcares como inhibidores de hexosaminidasas y su aplicación a la síntesis de la 1-desoxialonojirimicina (DAJNAc).

El desarrollo de los capítulos de esta Tesis ha dado lugar a la preparación de una serie de nuevos compuestos y precursores cuyas estructuras se presentan a continuación:

Derivados de DNJ y de L-DIJ y precursores.

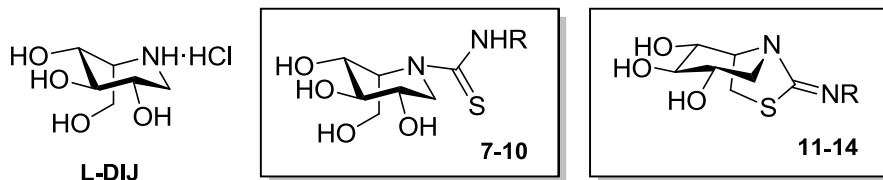


DNJ

1, 4, R = (CH₂)₃CH₃

2, 5, R = (CH₂)₇CH₃

3, 6, R = Ph

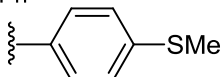


L-DIJ

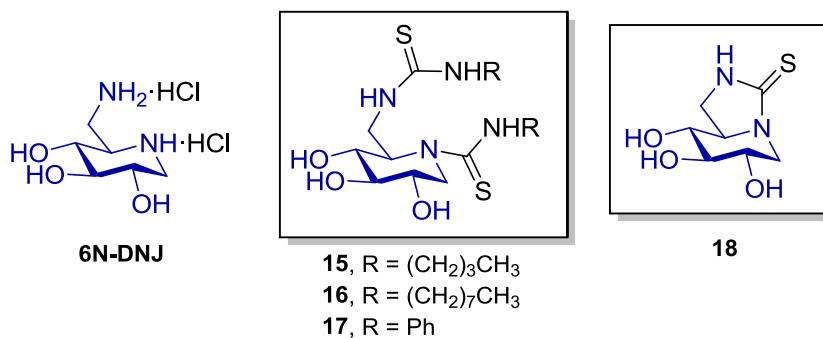
7, 11, R = (CH₂)₃CH₃

8, 12, R = (CH₂)₇CH₃

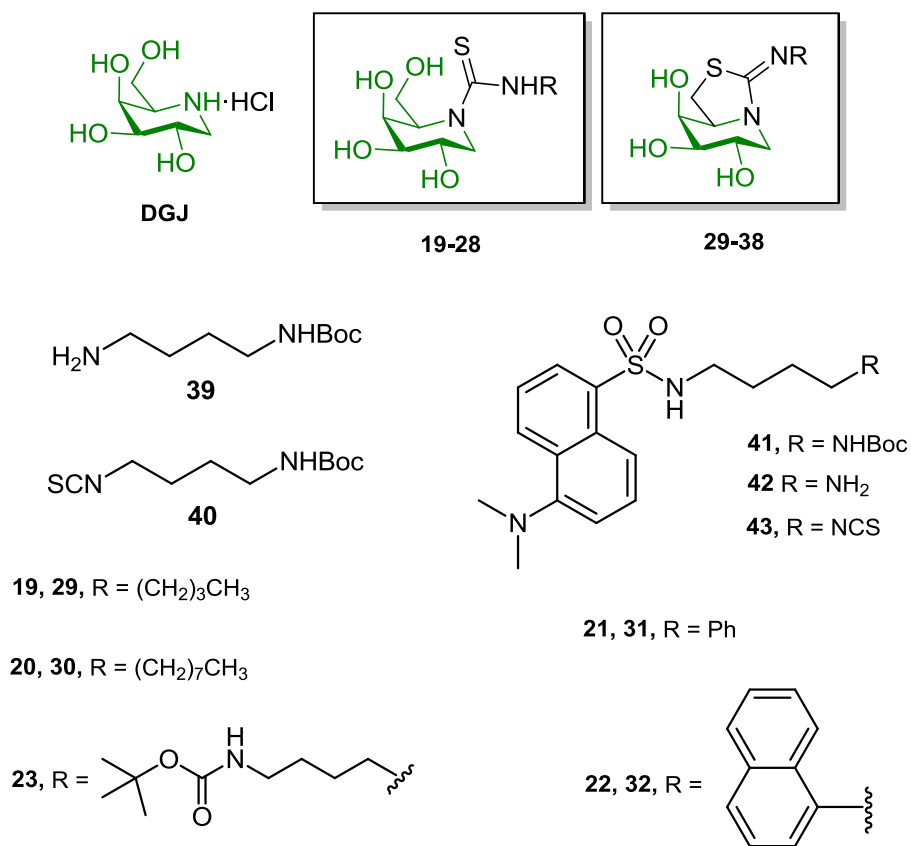
9, 13, R = Ph

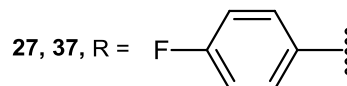
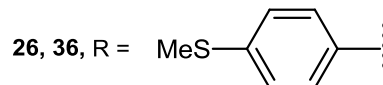
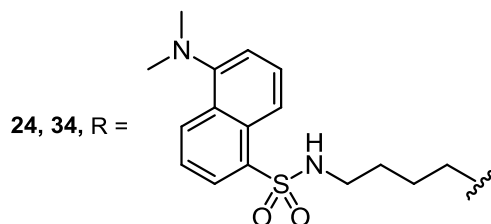
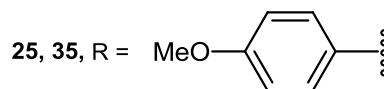
10, 14, R = 

Derivados de 6N-DNJ y precursores.

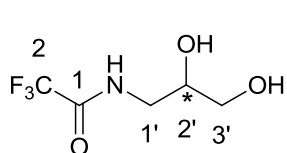


Derivados de DGJ y precursores.

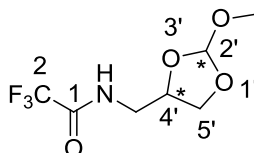




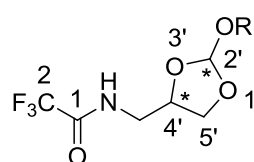
Derivados de DNJ, DGJ y de 6-oxacalistequina B₂ que poseen un interruptor biológico y precursores.



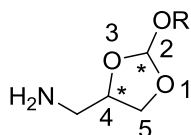
(±)-44
(2'R)-45
(2'S)-46



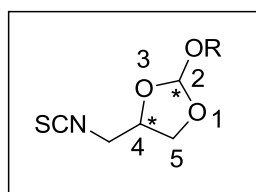
(±)-47
(2'S, 4'R)-48 *R_fa*
(2'R, 4'R)-48 *R_fb*
(2'R, 4'S)-49 *R_fa*
(2'S, 4'S)-49 *R_fb*



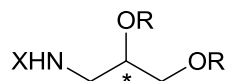
(±)-50, R = (CH₂)₃CH₃
 (±)-51, R = (CH₂)₇CH₃
 (2'*R* y 2'*S*, 4'*R*)-52, R = (CH₂)₇CH₃
 (2'*R* y 2'*S*, 4'*S*)-53, R = (CH₂)₇CH₃
 (±)-54, R = (CH₂)₁₁CH₃



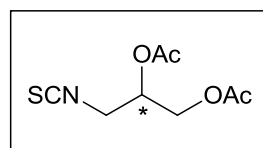
(±)-55, R = (CH₂)₃CH₃
 (±)-56, R = (CH₂)₇CH₃
 (2*R* y 2*S*, 4*R*)-57, R = (CH₂)₇CH₃
 (2*R* y 2*S*, 4*S*)-58, R = (CH₂)₇CH₃
 (±)-59, R = (CH₂)₁₁CH₃



(±)-60, R = (CH₂)₃CH₃
 (±)-61, R = (CH₂)₇CH₃
 (2*R* y 2*S*, 4*R*)-62, R = (CH₂)₇CH₃
 (2*R* y 2*S*, 4*S*)-63, R = (CH₂)₇CH₃
 (±)-64, R = (CH₂)₁₁CH₃

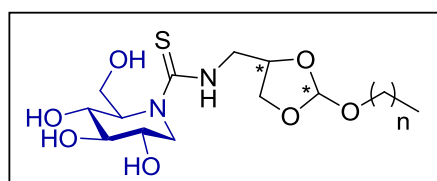


(±)-65, R = H, X = Boc
(R)-66, R = H, X = Boc
(S)-67, R = H, X = Boc
(±)-68, R = OAc, X = Boc
(R)-69, R = OAc, X = Boc
(S)-70, R = OAc, X = Boc
(±)-71, R = OAc, X = H
(R)-72, R = OAc, X = H
(S)-73, R = OAc, X = H

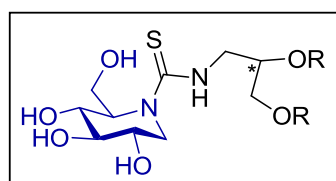


(±)-74
(R)-75
(S)-76

Configuración D-gluco

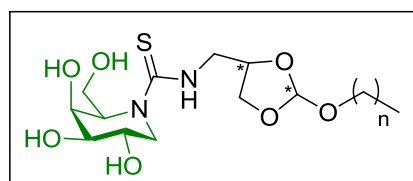


77, n = 3
78, n = 7
79, n = 11

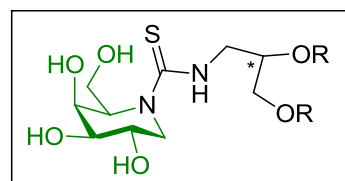


80, R = Ac
81, R = H

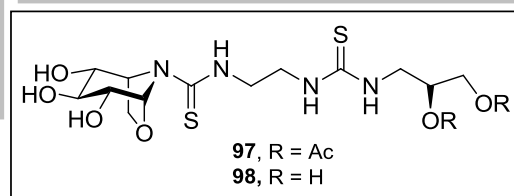
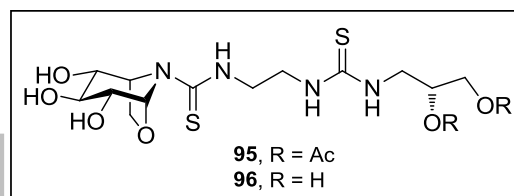
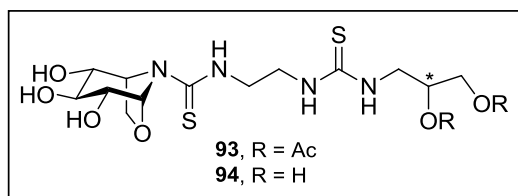
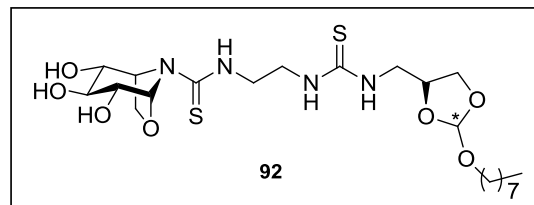
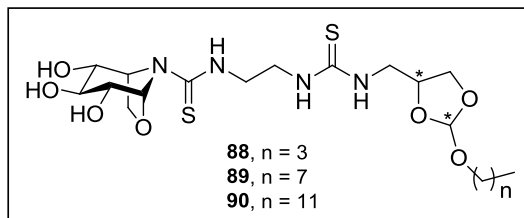
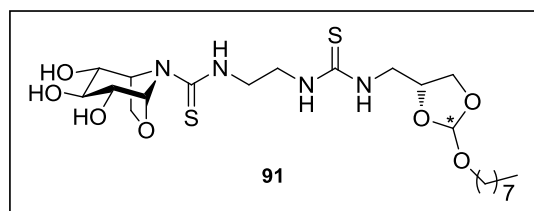
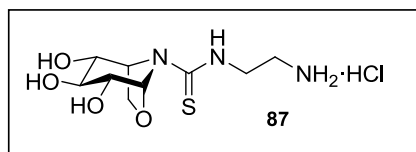
Configuración D-galacto



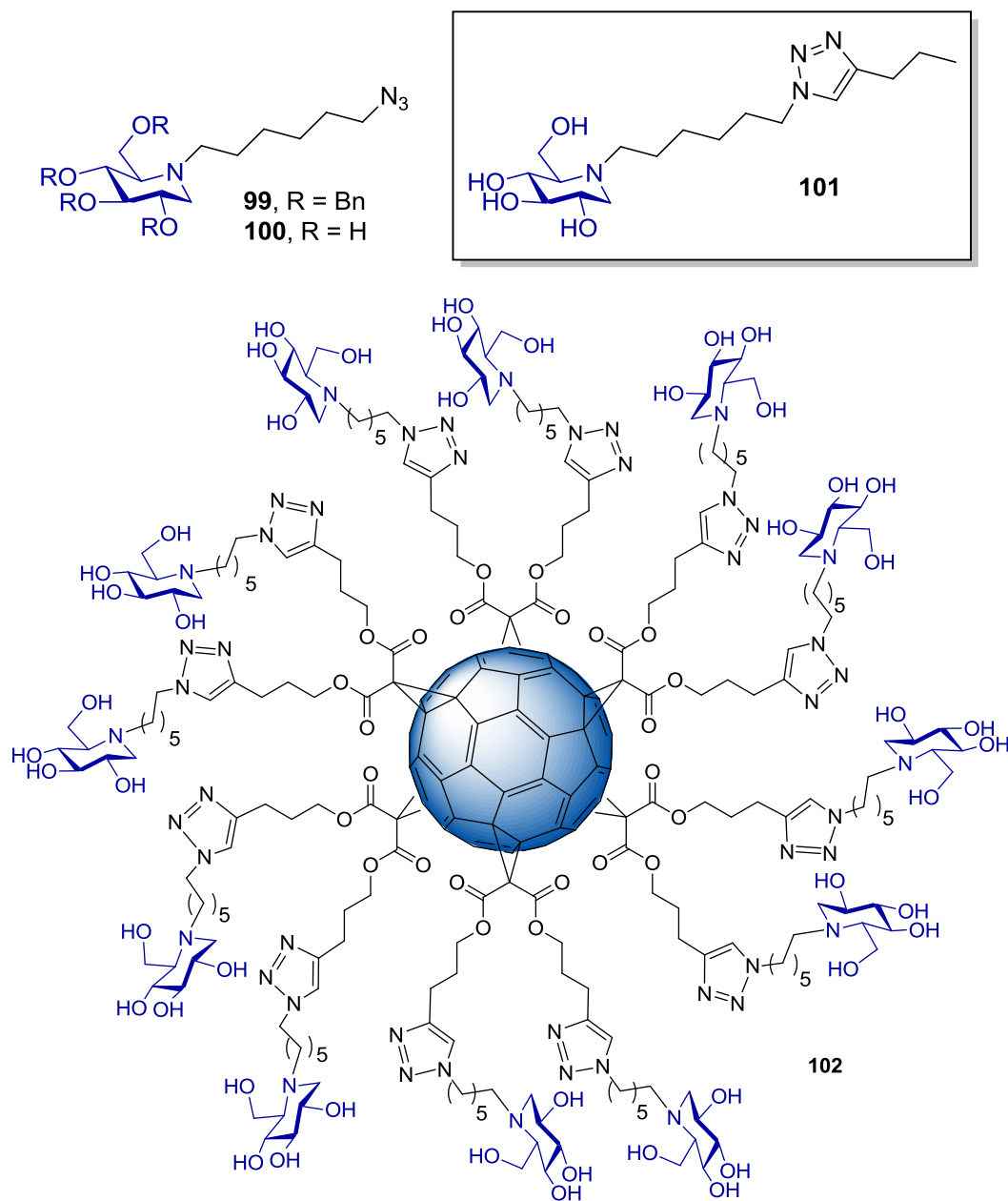
82, n = 3
83, n = 7
84, n = 11



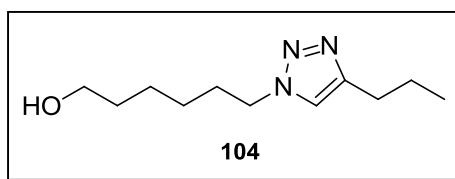
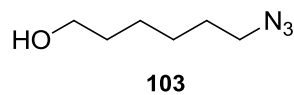
85, R = Ac
86, R = H

Derivados de 6-oxacalistegina B₂

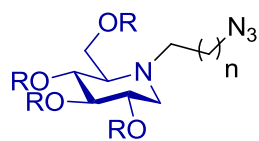
Conjugados multivalentes tipo clic de fullereno—iminoazúcar derivados de DNJ y precursores.



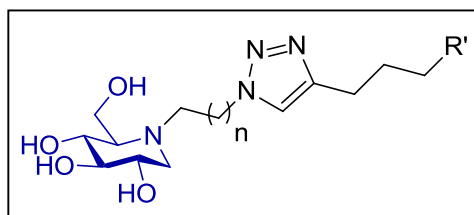
Conjugados multivalentes tipo clic de β CD—iminoazúcar derivados de DNJ y DMJ y precursores.



Configuración D-gluco

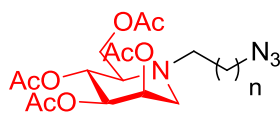


- 99**, R = Bn, n = 5
105, R = Bn, n = 8
100, R = H, n = 5
106, R = H, n = 8
107, R = Ac, n = 5
108, R = Ac, n = 8

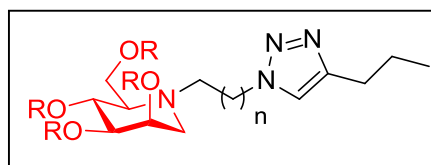


- 101**, R' = H, n = 5
109, R' = H, n = 8
110, R' = OAc, n = 5
111, R' = OAc, n = 8

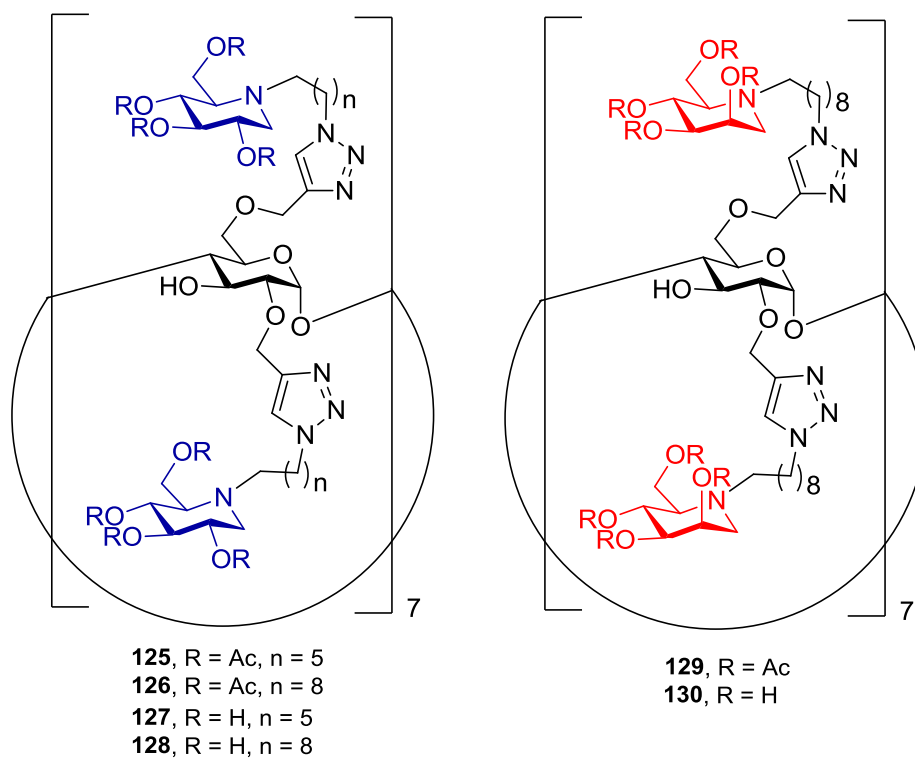
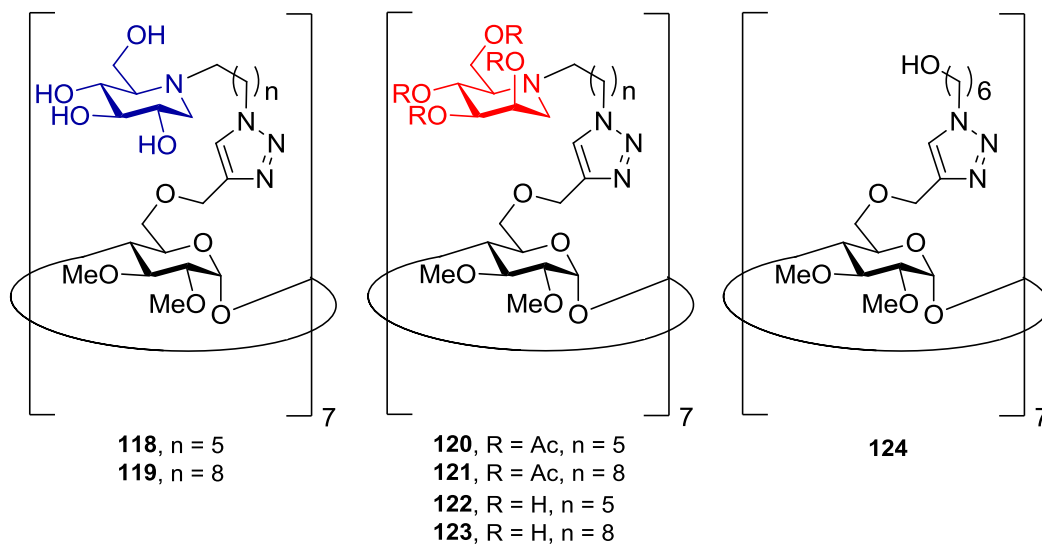
Configuración D-mano

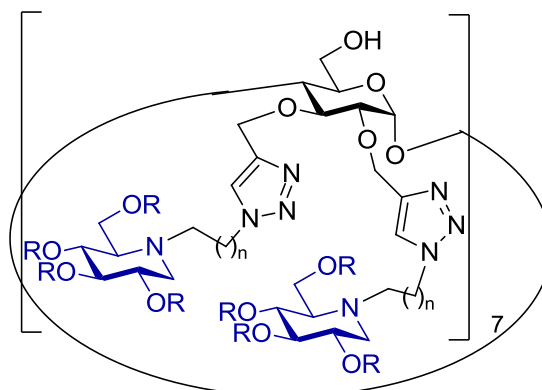


- 112**, n = 5
113, n = 8



- 114**, R = Ac, n = 5
115, R = Ac, n = 8
116, R = H, n = 5
117, R = H, n = 8





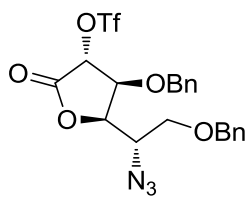
131, R = Ac, n = 5

132, R = Ac, n = 8

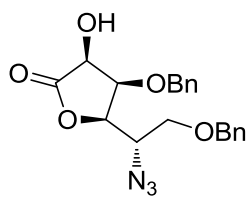
133, R = H, n = 5

134, R = H, n = 8

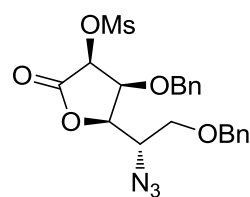
Iminoazúcares derivados 2,5-didesoxi-2,5-imino-L-iditol y 2,5-didesoxi-2,5-imino-L-gulitol y precursores.



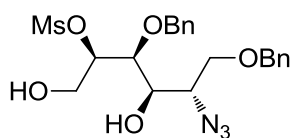
135



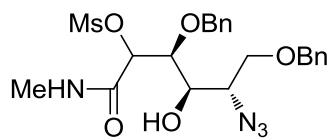
136



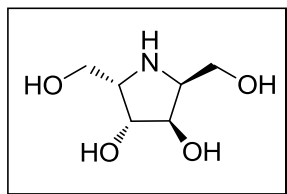
137



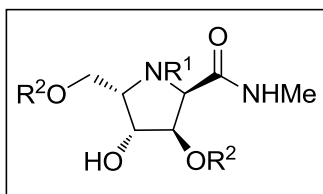
138



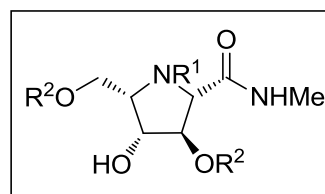
139



140

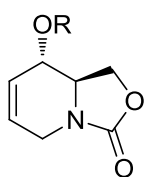


141, $R^1 = \text{Boc}$, $R^2 = \text{Bn}$
 142, $R^1 = R^2 = \text{H}$

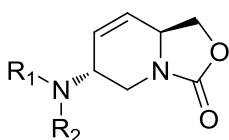


143, $R^1 = \text{Boc}$, $R^2 = \text{Bn}$
 144, $R^1 = R^2 = \text{H}$

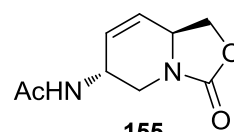
Derivados de DAJNAc y precursores.



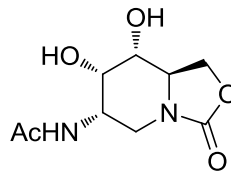
145, $R = \text{Ac}$
 146, $R = \text{CO}_2\text{Et}$



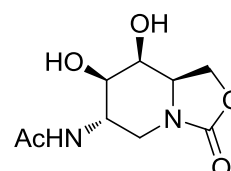
147, $R_1 = \text{Bn}$ $R_2 = \text{H}$
 148, $R_1 = \text{Bn}$ $R_2 = \text{Bn}$
 149, $R_1 = i\text{Pr}$ $R_2 = i\text{Pr}$
 150, $R = \text{Piperidina}$
 151, $R = \text{Morfolina}$
 152, $R = \text{Hexametilineimina}$
 153, $R = \text{Isoindolina}$
 154, $R = \text{Pfalimida}$



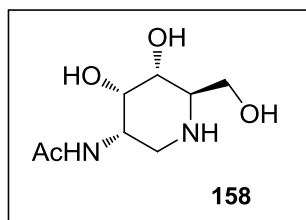
155



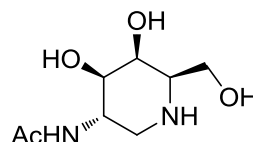
156



157



158

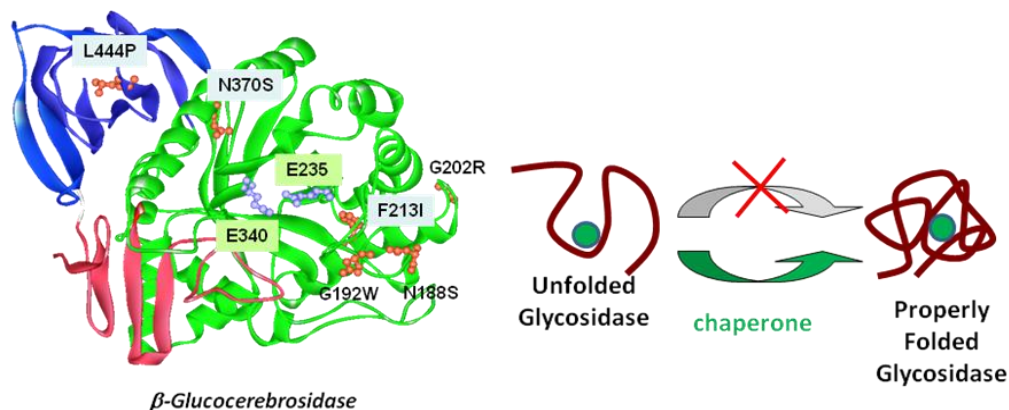


159

Capítulo 3

Síntesis de Iminoazúcares sp^2 derivados de DNJ y de L-DIJ como Chaperonas Farmacológicas para la Enfermedad de Gaucher

Abstract: Human acid β -glucosylceramidase (GlcCase o GBA1) is a potential drug target for the treatment of Gaucher disease and selective GlcCase inhibitors are evaluated as potential chemical chaperones (PCs). Glucosylceramide synthase (GCS) is a promising target for the clinical drug development for the treatment of lysosomal storage disorders, which inhibitors are evaluated for substrated reduction therapy. In this chapter, we report our identification of DNJ-derivatives as potent inhibitors of GlcCase and L-DIJ-derivatives as potent inhibitors of GCS. Combination of both new families must reduce the lysosomal accumulation of glucosylceramide for Gaucher's disease.



3. Síntesis de iminoazúcares sp^2 derivados de DNJ y de L-DIJ como chaperonas farmacológicas para la enfermedad de Gaucher.

La mayor parte de las moléculas que se encuentran bajo estudio como posibles PCs para GD mimetizan en su estructura el residuo de D-glucopiranososa, la porción glicónica del sustrato de la GlcCasa, la GlcCer. En la Figura 3.1 se muestran algunos ejemplos de este tipo de derivados, iminoazúcares como la DNJ o IFG y sus derivados *N*-alquilados. Como se ha comentado en la Introducción General, estos derivados presentan una buena actividad inhibitoria de enzimas con actividad α - o β -glucosidasa, respectivamente. Una dificultad de este tipo de derivados es que muestran generalmente una selectividad insuficiente frente a glicosidasas, lo que compromete su aplicación terapéutica.¹ Otras estructuras prometedoras como PCs, como los iminoazúcares *C*-sustituidos (e.g. α -1-*C*-nonil-imino-D-xilitol, α -C₉-DIX²) o los glicomiméticos con estructura de aminociclitoles (e.g. *myo*-(C₉)₂),³ requieren rutas sintéticas relativamente costosas. Por su parte, los glicomiméticos bicíclicos reductores de tipo iminoazúcar sp^2 ,⁴ desarrollados en nuestro grupo, como la 6S-NOI-NJ,⁵ han demostrado excelentes propiedades como inhibidores de glicosidasas y se comportan como PCs frente a varias mutaciones asociadas a GD capaces de cruzar la barrera hematoencefálica y de incrementar la actividad residual de enzimas lisosomales mutantes en neuronas.⁶ Sin embargo, estos derivados no muestran actividad chaperona en fibroblastos homocigóticos L444P,⁵ una mutación asociada a los fenotipos 2 y 3 de GD y que está localizada en una región (región II), que no es la región catalítica de la enzima. Sólo algunos ejemplos de PCs, entre los que se encuentra el ambroxol (ABX),⁷ una molécula que no tiene estructura de iminoazúcar, y los derivados de L-idonojirimicina comentados, son activos frente a esta mutación.

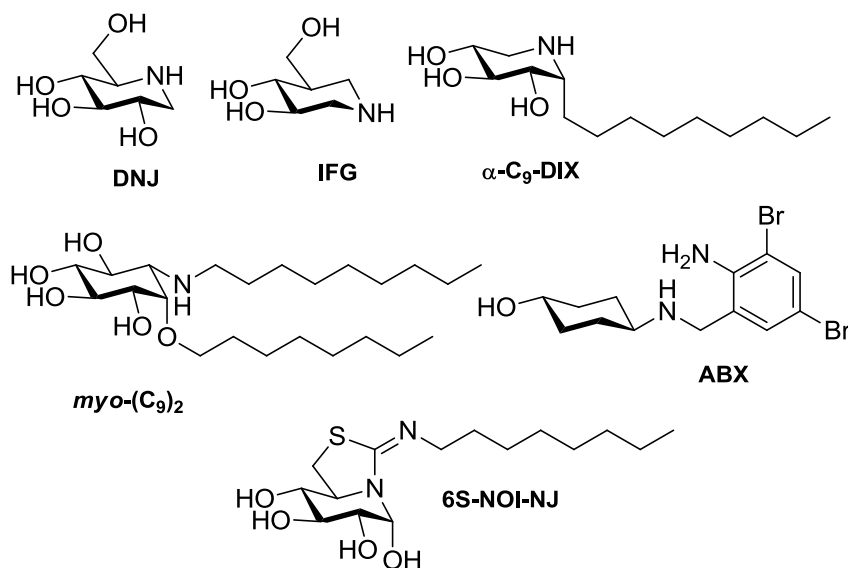


Figura 3.1. Estructuras de derivados bajo estudio como PCs para GD.

En el marco de una Tesis anterior del grupo de investigación, se preparó una serie de iminoazúcares sp^2 bicíclicos de configuración D-*gluco* y D-*galacto* (**160-163**; Figura 3.2 A), que se comportaron como inhibidores potentes y selectivos de GlcCasa.⁸ Estos derivados mejoraron la actividad de varias GlcCasas mutantes en fibroblastos humanos de pacientes de Gaucher, siendo particularmente eficaces en el caso de mutaciones neuronopáticas entre las que no se encontraba la L444P.⁸ La colaboración con el Prof. Gideon Davies de la Universidad de York permitió llevar a cabo un estudio cristalográfico⁵ de los complejos formados por la β -glucosidasa de *Thermotoga maritima* (TmGH1) y los derivados de configuración D-*gluco* **160** y **162** y el derivado de configuración D-*galacto* **163** (Figura 3.2 B). Las estructuras de rayos X correspondientes a los complejos enzima-inhibidor mostraron en los tres casos que el anillo de piperidina de los iminoazúcares adopta, en el sitio activo de la enzima, una conformación de silla distorsionada próxima a 4E con el grupo imino en configuración Z, en contraste con la conformación 4C_1 con el grupo imino en configuración E observada en los espectros de

^1H RMN en D_2O . Sorprendentemente, el centro pseudoanomérico se encontró en la configuración β , a pesar de que en disolución acuosa únicamente se detectó la configuración α , con el hidroxilo en disposición axial (Figura 3.2 B).

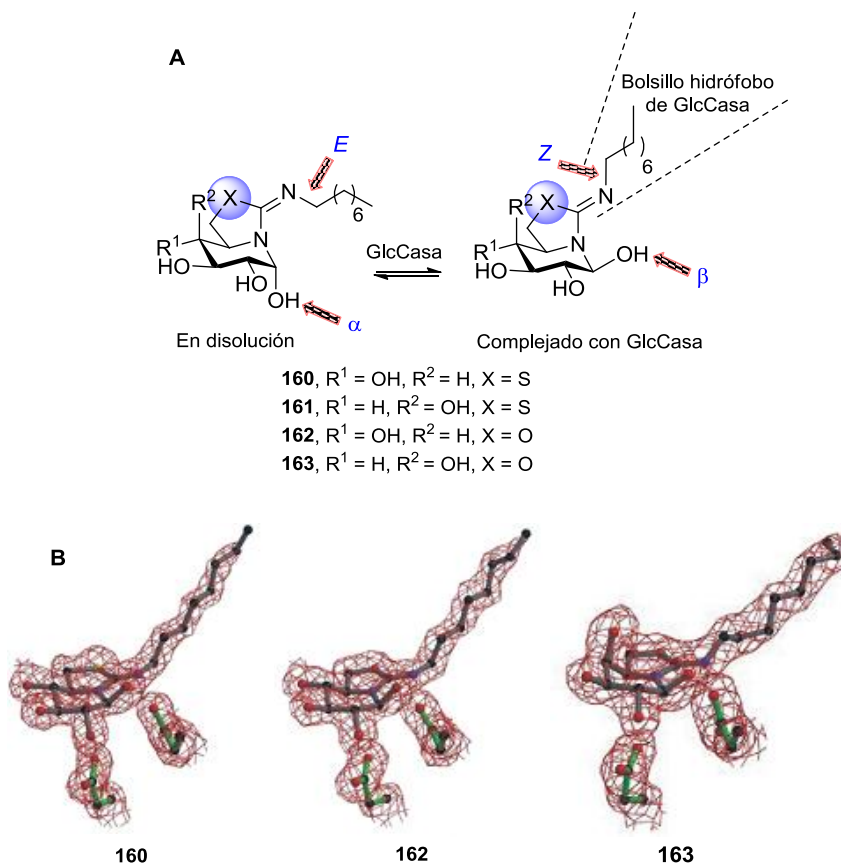


Figura 3.2. (A) Estructura de los iminozúcares incluidos en el estudio cristalográfico con la β -glucosidasa de *Thermotoga maritima*. (B) Estructura de los complejos entre *TmGH1* y **160**, **162** y **163**.

La enzima GlcCasa posee un bolsillo hidrófobo en las cercanías del sitio activo que interacciona con el sustituyente pseudoaglicónico de los iminoazúcares sp^2 en orientación Z del iminoazúcar. Un análisis preliminar mediante docking sugirió que los

residuos de aminoácidos del sitio activo de α -glucosidasa o de α - y β -galactosidasas generarían contactos estéricos desfavorables al incorporar estos glicomiméticos, impidiendo de hecho la formación de los correspondientes complejos, lo que explicaría la alta selectividad mostrada hacia β -glucosidasas. Este estudio también puso de manifiesto que el hidroxilo de la posición anomérica en los derivados reductores **160-163** no interacciona directamente con los residuos de aminoácidos del sitio activo de la enzima y que la selectividad observada frente a β -glucosidasas está gobernada, fundamentalmente, por la orientación relativa que adopta el sustituyente pseudoaglicónico en el sitio activo de la enzima. Finalmente, un estudio termodinámico, mediante microcalorimetría, de la unión entre los derivados **160-163** y la enzima *TmGH1* puso de manifiesto que la formación del complejo enzima-inhibidor estaba desfavorecida entálpicamente, probablemente debido al coste energético que supone que la enzima interaccione con el anómero menos favorecido en disolución.⁵ El conjunto de resultados anteriores sugiere que las interacciones pseudoaglicónicas del iminoazúcar con los residuos de aminoácidos próximos al sitio activo de la enzima juegan un papel fundamental en la inhibición de glicosidasas, mayor que la derivada de la presencia o no de un grupo hidroxilo en la posición pseudoanomérica, por lo que el estudio de dichas interacciones resulta imprescindible en el diseño de PCs dirigidas al centro activo de la enzima.

Adicionalmente, en colaboración con el Prof. A. Futerman del Instituto Weizmann de Israel, se llevó a cabo un estudio estructural del complejo enzima-inhibidor formado entre la GlcCasa recombinante (Taliglucerasa α , prGCD)⁹ y el derivado **164**, un iminoazúcar sp^2 que incorpora una función guanidina (Figura 3.3). Las estructuras obtenidas se han comparado con la correspondiente a la *N*-nonil-DNJ (NN-DNJ), que se encuentra en estudios preclínicos para la PCT, y a la *N*-butil-DNJ (NB-DNJ), que actualmente se emplea en la terapia SRT en GD.

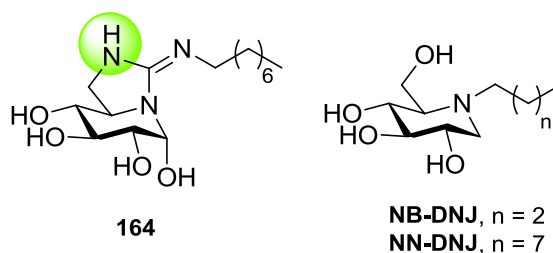


Figura 3.3. Estructuras de los iminozúcares incluidos en el este estudio cristalográfico con prGCD.

El derivado **164** se comportó como un inhibidor potente y selectivo de la GlcCasa ($IC_{50} = 4 \mu M$), en el mismo rango que la NN-DNJ ($IC_{50} = 1 \mu M$),¹⁰ pero mucho más selectivo, ya que no mostró inhibición frente a la α -glucosidasa humana lisosomal (NN-DNJ presenta un IC_{50} de $1.5 \mu M$ frente a esta última glicosidasa).¹¹ En el caso del complejo de la prGCD con la guanidina cíclica **164** se observó que la enzima selecciona el anómero α , en contraste con lo observado para los derivados bicíclicos **160-163** con la TmGH1, en los que el anómero seleccionado es el β . En cualquier caso, el anillo de piperidina se encuentra distorsionado de manera análoga a lo observado en los casos anteriores, presentando una conformación 4E , con el hidroxilo pseudoanomérico en una orientación pseudoecuatorial. Este estudio estructural indica además que el iminoazúcar **164** se une al sitio activo de manera similar a la NN-DNJ¹² y a la NB-DNJ (Figura 3.4). Una conclusión importante del trabajo es que la presencia de un grupo hidroxilo pseudoanomérico capaz de adoptar una configuración α o β no supone una restricción importante para la adaptación al sitio activo de α o β glucosidasas, corroborando lo observado para la enzima de TmGH1. Además, puede concluirse que la estructura bicíclica impone una restricción a la orientación del sustituyente sobre el átomo de nitrógeno exocíclico que facilita su adaptación al bolsillo hidrofóbico próximo al sitio activo en la enzima. Esta condición parece determinar la selectividad frente a β -glucosidasas.

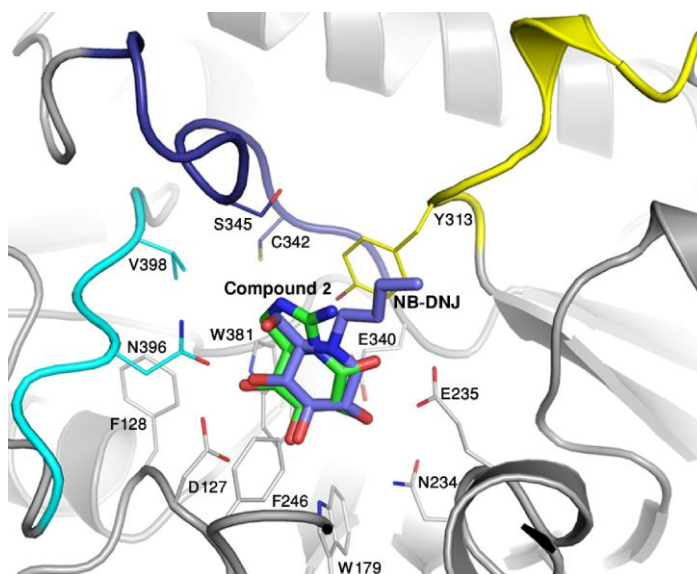


Figura 3.4. Comparación de las regiones del sitio activo de los complejos de NB-DNJ y **164** con prGCD.

Los derivados de configuración D-*gluco* **160**, **162** y **164** se han estudiado además como PCs para el tratamiento de GD.⁵ En un primer barrido, se encontró que los derivados **160**, **162** y **164** mejoraban la actividad de varias GlcCasas mutantes de enfermos de Gaucher, mientras que el compuesto **161** fue el único análogo de galactonojirimicina (GJ) que mostró actividad chaperona, obteniéndose, en general, mejores resultados para la mayoría de las mutaciones que con la NN-DNJ. Además, ninguno de los derivados mostró citotoxicidad en fibroblastos para el rango de concentraciones estudiado. A la vista del conjunto de resultados comentados, puede concluirse que la selectividad de acción de los iminoazúcares sp^2 está mucho más relacionada con el esqueleto bicíclico y la naturaleza de la cadena lateral que con la presencia y configuración del hidroxilo anomérico. De hecho, la inversión de la configuración observada entre la situación en disolución y en el sitio activo de la enzima implica un coste energético.

Un ejemplo interesante de selectividad de inhibición dentro de la familia de los iminoazúcares es el de los derivados *N*-alquilados de configuración *L-ido* (L-DIJ) descritos por J. M. F. G. Aerts y H. S. Overkleeft. Estos compuestos se comportan como inhibidores potentes y específicos de GCS, con valores de K_i en el rango nanomolar, presentando una afinidad 10 veces mayor que sus análogos de configuración *D-gluco* por la GlcCasa y total inactividad frente a las glicosidasas intestinales (isomaltasa y sacarasa) (Figura 3.5).¹³ El cociente entre las constantes de inhibición para GlcCasa/GCS es mucho más elevado que para los derivados de L-DIJ (175 para el derivado **170** y 950 para el derivado **175**), lo cual es indicativo de una alta selectividad hacia GCS.¹³

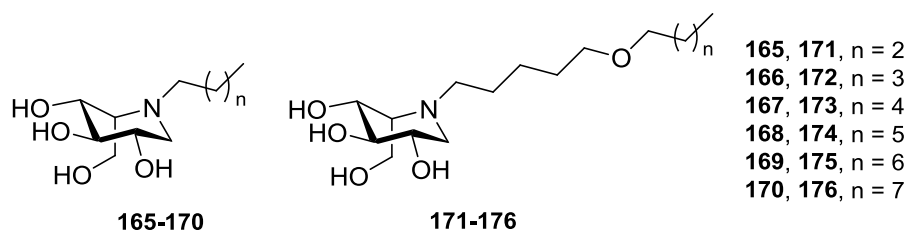


Figura 3.5. Estructuras de los iminoazúcares de configuración *L-ido*, inhibidores de GCS, sintetizados por Aerts y Overkleeft.

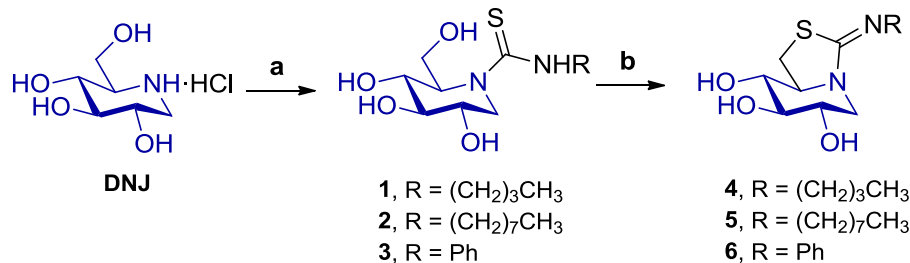
El hecho de que glicomiméticos con configuración *L-ido* sean aceptados en el sitio activo de enzimas que procesan *D*-glucósidos es significativo. Al no tratarse de la configuración complementaria, cabe esperar que la selectividad entre isoenzimas o incluso entre diferentes enzimas mutantes sea mayor, lo que podría traducirse en selectividades más altas y variaciones en los perfiles de actividad en comparación con los derivados de DNJ.

Los antecedentes comentados apuntan a que tanto la eliminación del hidroxilo anomérico en los iminoazúcares sp^2 como la preparación de compuestos de configuración *L-ido* son estrategias que merecen ser exploradas en el diseño de inhibidores de glicosidasas con miras a la identificación de candidatos en PCT o SRT. Una combinación de ambas terapias debería reducir considerablemente el acúmulo intralisosomal de

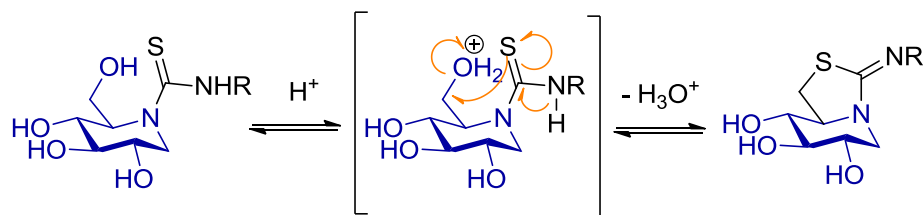
GlcCer y mejorar así las patologías derivadas de GD, incluso en pacientes con afecciones neuronopáticas. Una comparación directa de derivados mono y bicíclicos también es interesante, dada la dependencia de la actividad con la topología del núcleo polihidroxilado y la orientación de los sustituyentes sobre el mismo. En este capítulo se presentarán las metodologías que se han desarrollado para ello en el marco de esta Tesis y la evaluación biológica de los compuestos preparados.

3.1. Preparación de iminoazúcares sp^2 derivados de DNJ y L-DIJ y evaluación de su actividad como inhibidores de glicosidasas.

La preparación de los derivados monocíclicos de DNJ (**1-3**) se llevó a cabo mediante el acoplamiento directo del hidrocloreto de DNJ¹⁴ con los correspondientes isotiocianatos comerciales (butilo, octilo y fenilo) en piridina y en presencia de Et₃N como catalizador (Esquema 3.1) con un 49-75% de rendimiento. La ciclación intramolecular posterior (\rightarrow **4-6**) tuvo lugar bajo catálisis ácida implicando el desplazamiento del grupo hidroxilo primario (OH-6) por el átomo de azufre del grupo tiocarbonilo (Esquema 3.2).



Esquema 3.1. Preparación de derivados mono y bicíclicos de DNJ. Reactivos y condiciones: a, RNCS, py, Et₃N, t.a., 18 h, 49-75%; b, HCl conc., MeOH, t.a., 12 h, 40-99%.



Esquema 3.2. Mecanismo de formación de derivados bicíclicos de DNJ a partir de los derivados monocíclicos.

Las estructuras de los nuevos iminoazúcares mono y bicíclicos de DNJ se confirmaron mediante experimentos de ^1H y ^{13}C RMN, espectrometría de masas y microanálisis elemental. En el caso de los espectros de RMN, las diferencias más significativas se observan en los desplazamientos químicos de las señales de los espectros de ^{13}C RMN. Mientras que para los derivados monocíclicos podemos observar una señal alrededor de 185-190 ppm correspondiente al carbono tiocarbonílico (CS) y otra señal sobre 65 ppm correspondiente a C-6, los derivados bicíclicos presentan la señal del carbono imínico (C=N) sobre 170 ppm y la señal del C-6 unida a azufre alrededor de 30 ppm. En los espectros de ^1H RMN, los valores de las constantes de acoplamiento alrededor del anillo de piperidina sugieren una conformación de silla $^4\text{C}_1$ tanto en los derivados monocíclicos como en los bicíclicos (Figuras 3.6 y 3.7).

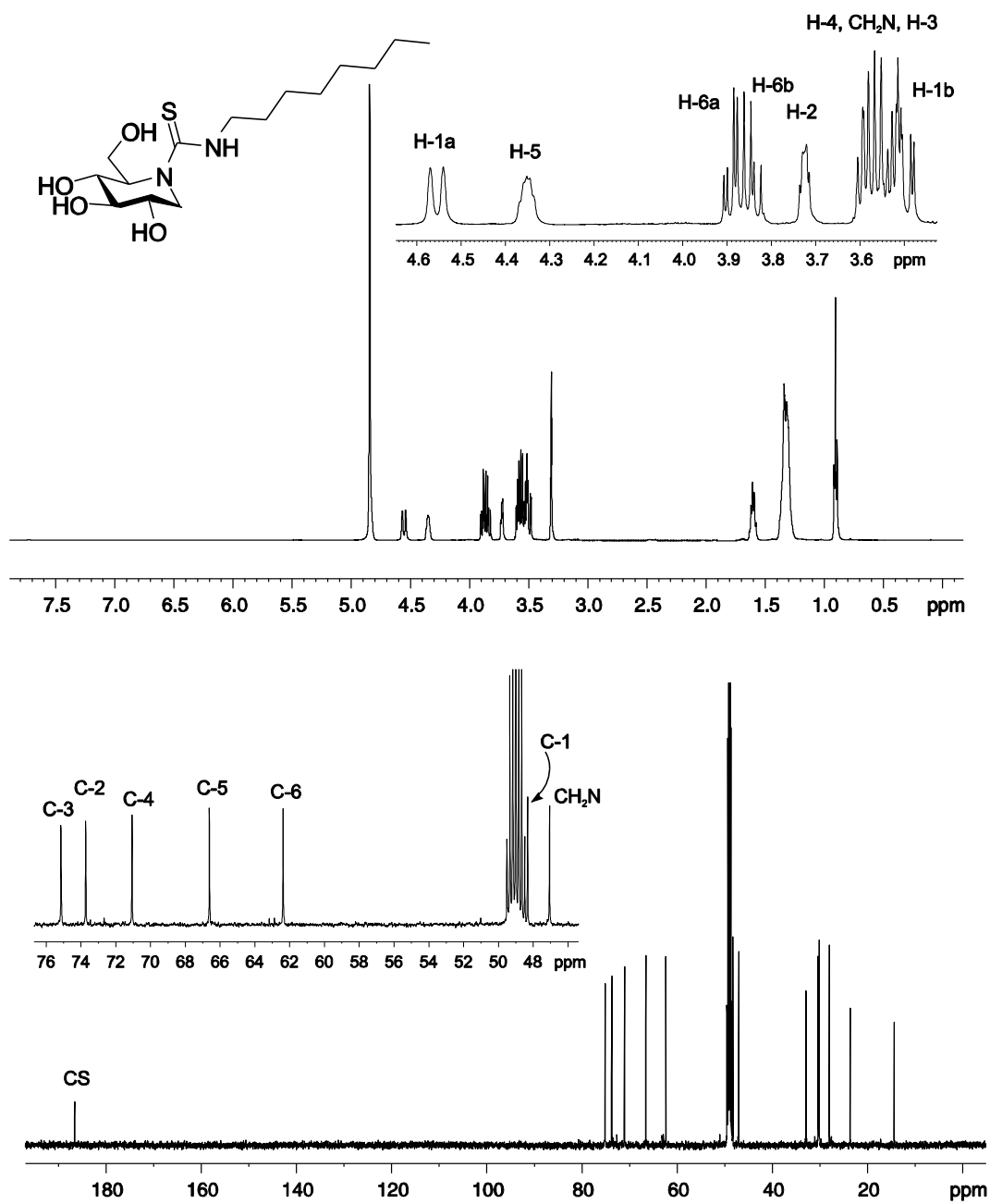


Figura 3.6. Espectros de ^1H y ^{13}C RMN (500 MHz, 125.7 MHz, CD_3OD) de 2.

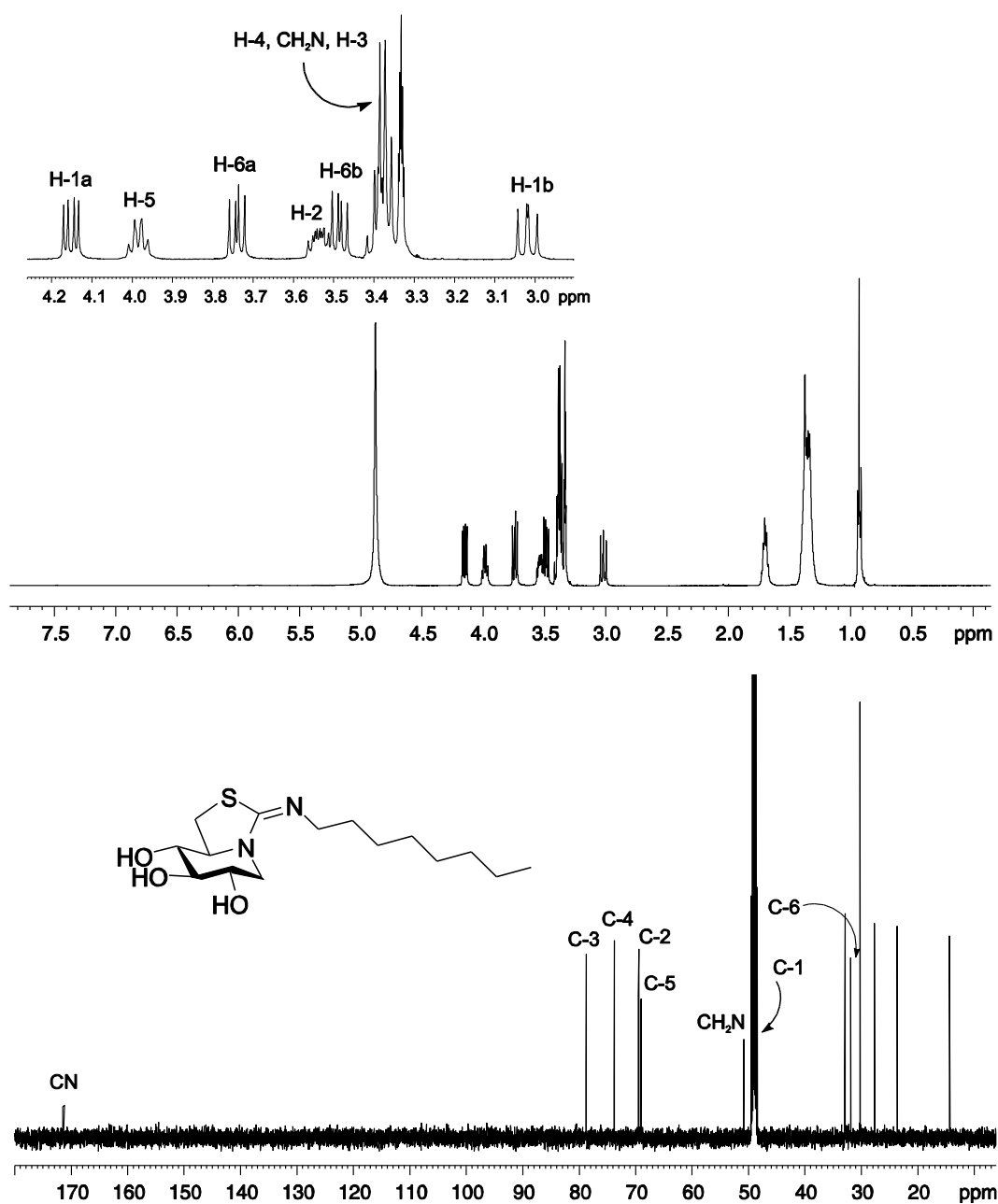


Figura 3.7. Espectros de ¹H y ¹³C RMN (500 MHz, 125.7 MHz, CD₃OD) de 5.

La estrategia utilizada nos ha permitido acceder de una manera rápida y sencilla a ambas familias de derivados de DNJ y evaluar la influencia de la naturaleza del sustituyente pseudoaglicónico sobre las propiedades de inhibición de glicosidasas (Tabla 3.1). Con objeto de seleccionar los mejores candidatos para su estudio como PCs en el tratamiento de GD, se ha llevado a cabo, en primer lugar, una evaluación de la actividad como inhibidores de glicosidasas frente a una colección de enzimas comerciales. La serie de glicosidasas estudiadas incluye α -glucosidasa (α -Glcasa, levadura panadera), β -glucosidasa (β -Glcasa, almendra), β -glucosidasa (β -Glcasa, hígado de buey), α -galactosidasa (α -Galasa, grano verde de café), β -galactosidasa (β -Galasa, *E. coli*), trehalasa (riñón de cerdo), α -manosidasa (α -Manasa, judías Jack), β -manosidasa (α -Manasa, *Helix pomatia*), isomaltasa (levadura), amiloglucosidasa (*Aspergillus niger*) y naringinasa (*Penicilium decumbens*, actividad β -glucosidasa/ β -ramnosidasa).

Tabla 3.1. Comparación de la actividad como inhibidores de glicosidasas (K_i , μM) para los derivados de DNJ.^a

ENZIMAS	Derivados monocíclicos			Derivados bicíclicos		
	1	2	3	4	5	6
α-Glcasa						
Levadura	568	481	60	n.i.	n.i.	406
Isomaltasa	203	129	18	n.i.	n.i.	34
Amiloglucosidasa	121	116	10	n.i.	n.i.	n.i.
Trehalasa	93	81	9.4	n.i.	n.i.	n.i.
β-Glcasa						
Hígado de buey	13	1.3	71	4.8	0.1	15
Almendra	20	1.3	24	1.1	0.045	57
Naringinasa	69	20	46	2.3	0.33	44
α-Glcasa						
Grano verde de café	847	n.i.	122	n.i.	n.i.	n.i.
β-Glcasa						
Hígado de buey	6.0	0.73	40	2.2	0.14	11
<i>Escherichia coli</i>	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	146	n.i.

n. i. No se detectó inhibición. ^aNinguno de los compuestos mostró inhibición frente a la enzima α -Manasa (judía Jack) y β -Manasa (*Helix pomatia*).

Todos los iminoazúcares evaluados se comportaron como inhibidores reversibles y competitivos, de acuerdo con las correspondientes representaciones de Lineweaver-Burk (Figura 3.8), y mostraron una importante selectividad hacia las β -Glucasas con valores de K_i en el rango micromolar, comportándose en cambio como inhibidores débiles o inactivos frente a α -Glucasas. Los derivados mono y bicíclico **2** y **5**, con sustituyente pseudoaglicónico *n*-octilo, resultaron ser los inhibidores más potentes y

selectivos frente a β -Glucosas de almendra y de hígado de buey (K_i 45 nM y 0.1 μ M, respectivamente, en el caso de **5**; Figura 3.8).

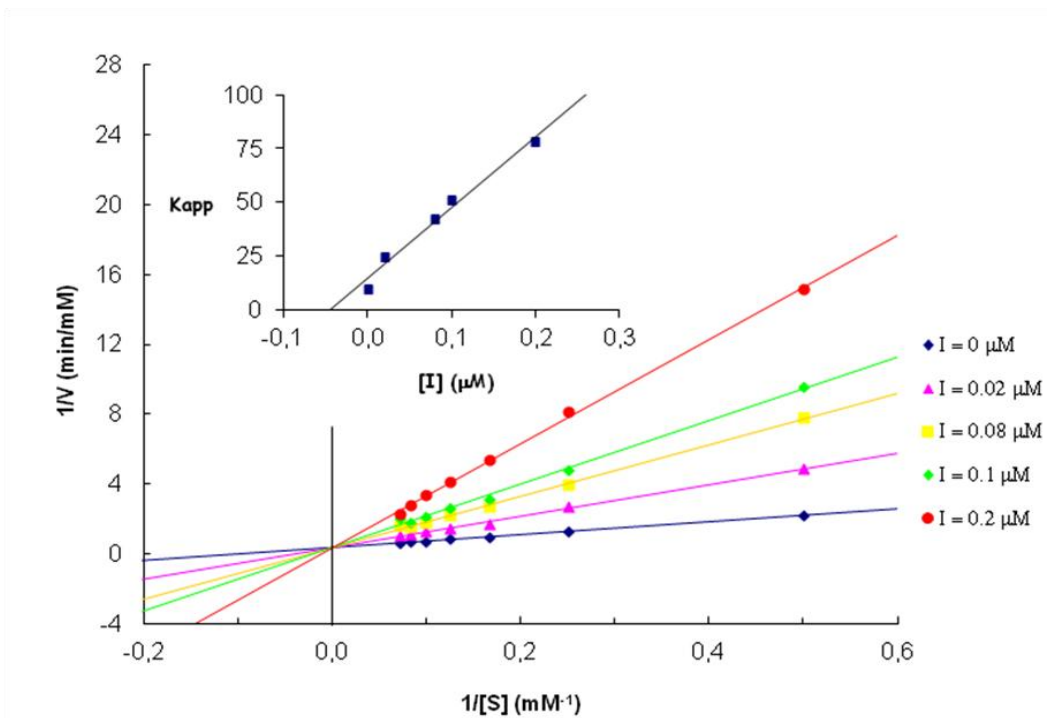
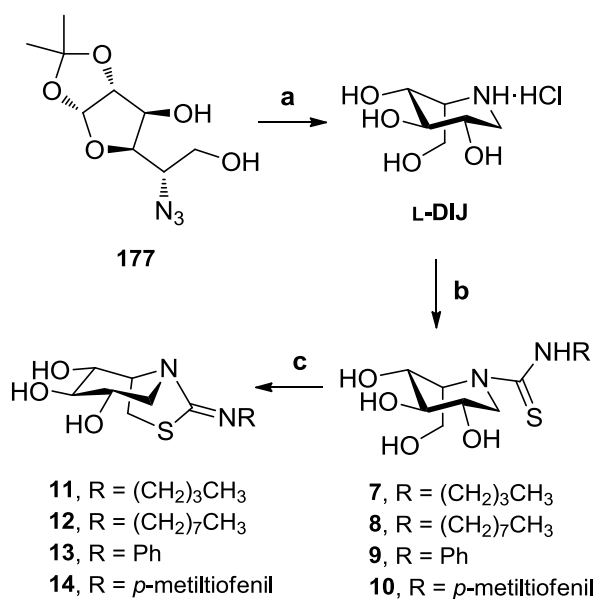


Figura 3.8. Representación de tipo Lineweaver-Burk para la determinación de K_i (45 nM) de **5** frente a la β -Glucasa (almendra; pH 7.3).

Para la preparación de los derivados de L-DIJ se siguió un esquema de síntesis análogo al descrito para los derivados de DNJ, partiendo de la 5-azido-5-desoxi-1,2-*O*-isopropiliden- α -L-idofuranosa **177**.¹⁴ La hidrólisis ácida del grupo isopropilideno de **177** seguida de hidrogenación catalítica y ciclación espontánea condujo a la correspondiente piperidina con un 67% de rendimiento global, que se aisló como hidrocloreuro tras adición de HCl 1 M y liofilización. Posteriormente, el acoplamiento con los isotiocyanatos comerciales (\rightarrow **7-10**, rendimiento 69-83%) y la posterior acidificación con HCl condujo a los derivados bicíclicos de L-DIJ **11-14** con rendimientos de buenos a excelentes (Esquema 3.3)



Esquema 3.3. Preparación de los derivados mono y bicíclicos de L-DIJ. Reactivos y condiciones: a, 1. TFA-H₂O 5:1, 0 °C, 30 min. 2. H₂, Pd/C, dioxano-H₂O 4:1, HCl 6 M, 25 bar, t.a., 30 h, 67% (dos etapas); b, RNCS, py, Et₃N, t.a., 18 h, 69-83%; c, HCl conc., MeOH, 65-85 °C, 2-8 h, 50-89%.

La estructura de los iminoazúcares mono y bicíclicos se confirmó usando las técnicas habituales. Los espectros de ¹H RMN (Figuras 3.9 y 3.10) son consistentes con la conformación de silla ⁴C₁ del anillo de piperidina de los nuevos derivados de L-DIJ. Los espectros de masas en modo ESI mostraron en todos los casos las señales correspondientes a los iones pseudomoleculares [M + Na]⁺.

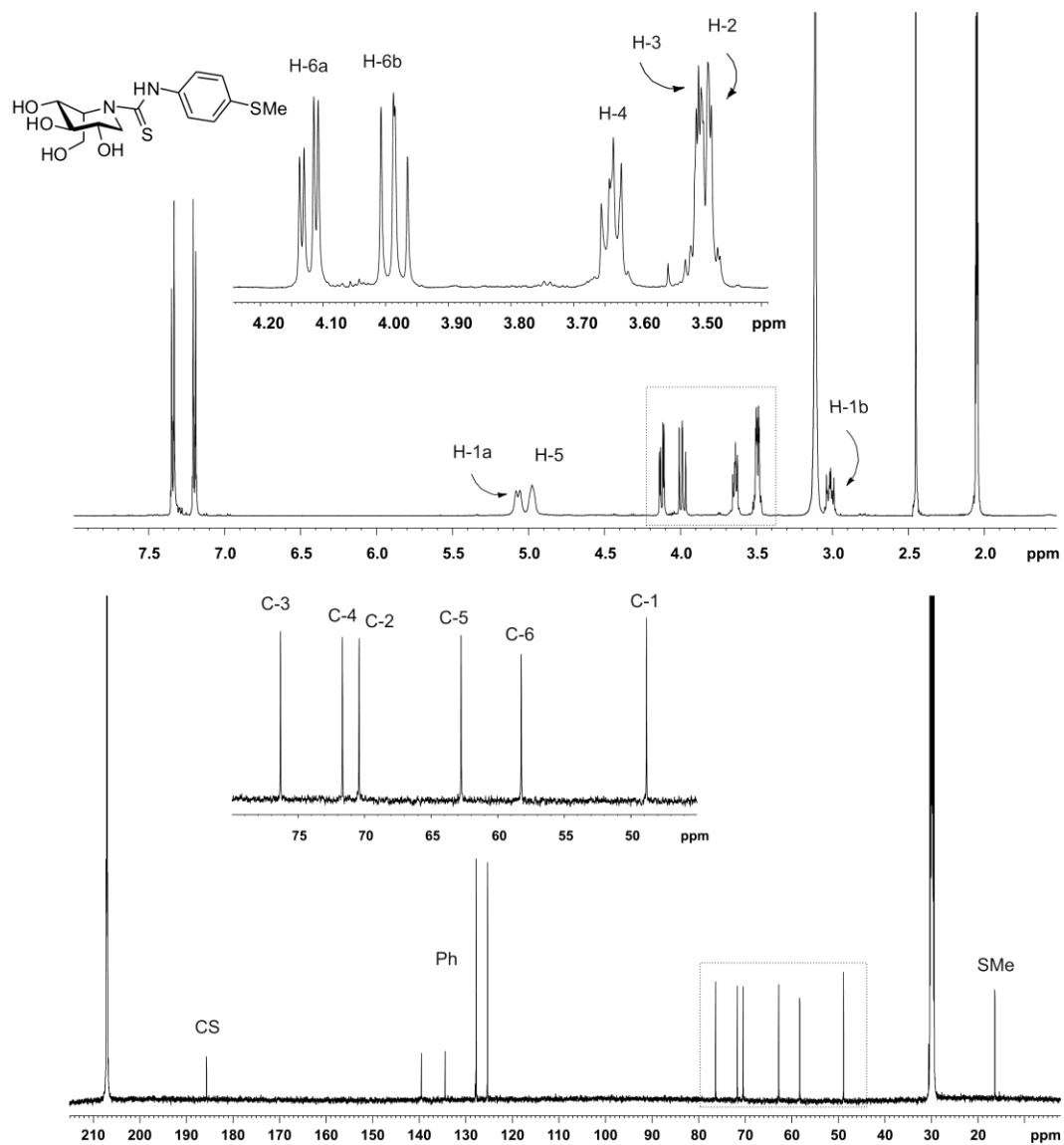


Figura 3.9. Espectros ^1H y ^{13}C RMN (500 MHz, 125.7 MHz, acetona- d_6 /D $_2$ O 9:1, 313 K) de **10**.

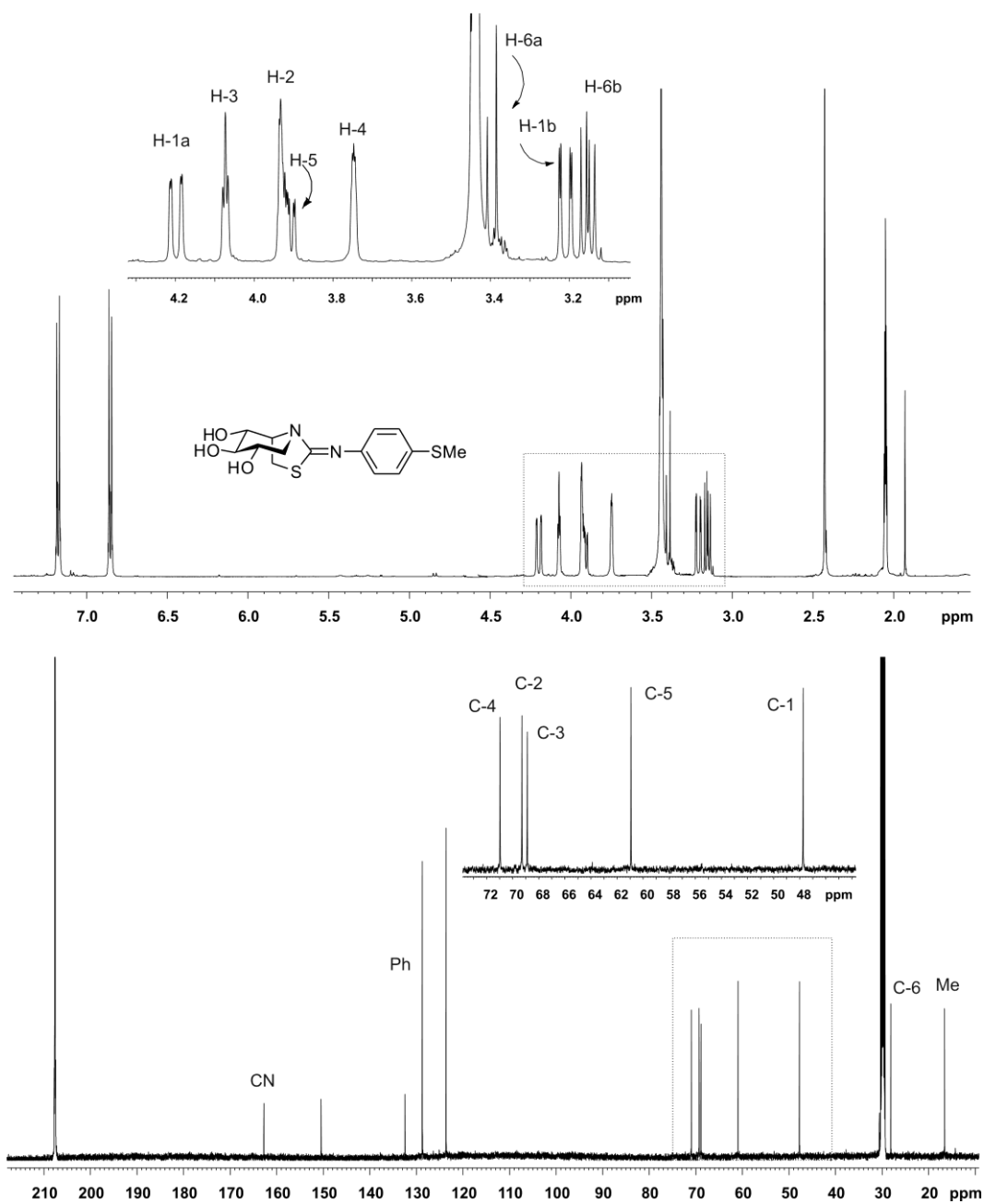


Figura 3.10. Espectros ^1H y ^{13}C RMN (500 MHz, 125.7 MHz, acetona- d_6 /D $_2$ O 9:1) de **14**.

Los nuevos iminoazúcares sp^2 de configuración *L-ido* se evaluaron en nuestro laboratorio frente a un panel de glicosidasas comerciales, incluyendo enzimas con actividad biológica α - y β -*Glcasa*, -*Manasa* y -*Galasa*. Muchos de los derivados de L-DIJ, tanto mono como bicíclicos, se comportaron como inhibidores moderados de la β -*Glcasa* de almendras. Como en el caso de los derivados de DNJ, los iminoazúcares **8** y **12**, con un sustituyente pseudoaglicónico *n*-octilo, se comportaron como inhibidores potentes de β -*Glcasa* de hígado de buey y de almendra a pH 7.3, presentando valores de K_i de 2.3 μ M y 3.9 μ M, respectivamente (Tabla 3.2).

Tabla 3.2. Comparación de la actividad como inhibidores de glicosidasas (K_i , μ M) para los derivados de L-DIJ.^a

ENZIMAS	Derivados monocíclicos				Derivados bicíclicos			
	7	8	9	10	11	12	13	14
α-Glcasa								
Levadura	n.i.	n.i.	293	n.i.	n.i.	n.i.	262	n.i.
Isomaltasa	n.i.	n.i.	271	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
Amiloglucosidasa	n.i.	n.i.	443	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
β-Glcasa								
Hígado de buey	n.d.	2.3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Almendra pH 7.3	51	227	294	555	19	3.9	309	n.i.
Almendra pH 5.5	217	525	279	n.i.	109	49	235	291
α-Galasa								
Grano verde de café	n.i.	60	77	n.i.	n.i.	504	772	n.i.
β-Galasa								
Hígado de buey	11	1.9	37	12	219	15	114	120

n. i. No se detectó inhibición. n.d. No determinado. ^aNinguno de los compuestos mostró inhibición frente a la enzima trehalasa (riñón de cerdo), naringinasa (*Penicilium decumbens*), β -Galasa (*E. Coli*), α -Manasa (judía Jack) y β -Manasa (*Helix pomatia*).

3.2. Estudio de la actividad frente a enzimas implicadas en la biosíntesis y catabolismo de la glucosilceramida y evaluación del potencial como chaperonas farmacológicas.

Una PC ideal debe unirse a la enzima defectuosa en el RE, promover su plegamiento correcto y transportarla hasta el lisosoma, orgánulo en el que se favorece la disociación del complejo enzima-chaperona debido a la acidez y al exceso de sustrato y donde la enzima libre ejerce su función catalítica. En la evaluación como chaperona de un candidato, se determina la capacidad que posee el derivado para aumentar la actividad enzimática residual de la enzima defectuosa y reducir los niveles de sustrato acumulado en los lisosomas. Mucho menos común es la evaluación de los candidatos a PCs como inhibidores de la enzima que biosintetiza el sustrato almacenado para conocer si la supresión del acúmulo de sustrato se debe al aumento de la actividad enzimática de la hidrolasa ácida o a la inhibición de la enzima sintasa correspondiente.

En los humanos, el metabolismo de la GlcCer viene determinado por la acción de la glucosilceramida sintasa (GCS) y las glucosilceramididasas ácida (GlcCasa o GBA1) y neutra (GBA2; Figura 3.11).

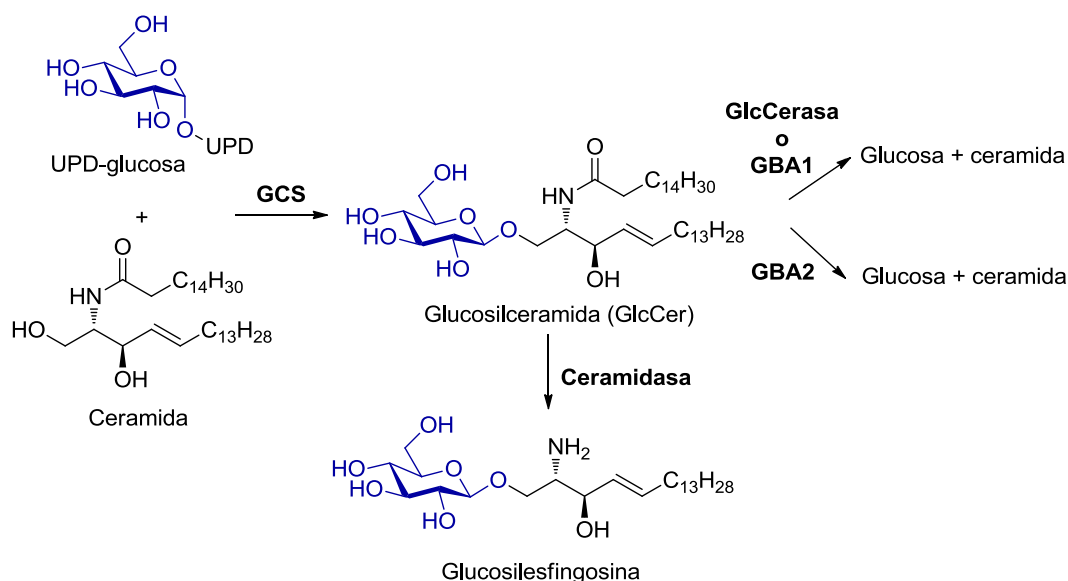


Figura 3.11. Biosíntesis y catabolismo de la GlcCer.

La evaluación de la actividad de algunos de los compuestos preparados como inhibidores de GCS o como PCs para GlcCerasa se ha abordado en colaboración con el grupo de investigación del Prof. J. M. F. G. Aerts (Academic Medical Center, Amsterdam). Como candidatos potenciales se han escogido los derivados mono y bicíclico de DNJ **2** y **5** (Figura 3.12), junto con otros iminoazúcares sp^2 preparados en el grupo de investigación y que muestran también una actividad potente frente a β -Glcasas, como los derivados bicíclicos reductores de DNJ **178**⁵ y **179**⁵ y el derivado de calistegina B₂ **180**.¹⁵ Como control se incluye el derivado de DNJ **MZ21**, que porta un sustituyente voluminoso e hidrofóbico como el adamantanometiloxipentilo, descrito previamente por el grupo del Prof. Overkleeft y previamente evaluado frente a estas enzimas.¹³

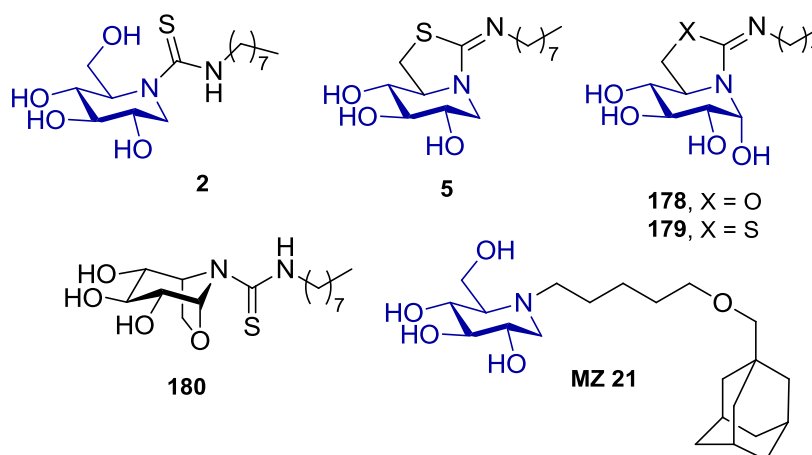


Figura 3.12. Estructuras de los iminoazúcares incluidos en el estudio de la biosíntesis y catabolismo de GlcCer.

En primer lugar, se llevó a cabo un análisis del perfil de inhibición de los iminoazúcares seleccionados frente a las enzimas GCS, GlcCasa y GBA2 implicadas en el metabolismo de la GlcCer. La chaperona de referencia, **MZ21**, inhibe a las tres enzimas (IC_{50} 0.2 μ M, 0.2 μ M y 0.001 μ M, respectivamente), siendo 250 veces más eficaz frente a la GBA2 neutra que frente a la GlcCasa ácida.¹³ Los iminoazúcares sp² mono y bicíclico **2** y **5** se comportaron como inhibidores potentes y altamente selectivos de GlcCasa con valores de IC_{50} 15 y 60 nM, respectivamente, de los más bajos descritos para esta enzima. Además, la potencia de inhibición de los dos derivados frente a GCS disminuyó tres órdenes de magnitud, lo que señala a los derivados **2** y **5** como candidatos atractivos para su estudio como chaperonas para GD (Tabla 3.3).

Tabla 3.3. Comparación de la actividad como inhibidores de GlcCasa, GBA2 y GCS (IC_{50} , μM) de los derivados seleccionados.

Derivado	GlcCasa	GBA2	GCS
2	0.015	15	> 20
5	0.06	35	> 20
178	1.2	0.4	> 20
179	0.7	15	> 20
180	2	> 1000	> 20
MZ 21	0.2	0.001	0.2

El estudio de la actividad chaperona sobre GlcCasa de los derivados seleccionados se llevó a cabo en primer lugar *in vitro* empleando fibroblastos humanos sanos. Las células fueron incubadas durante 72 horas en presencia o en ausencia de inhibidores y posteriormente se determinó la actividad enzimática de GlcCasa empleando 4-metilumbeliferona- α -D-glucopiranosido (4-MU) como sustrato. En estos ensayos se emplearon concentraciones crecientes de iminoazúcares equivalentes a los valores $0.1 \times IC_{50}$, $1 \times IC_{50}$ y $10 \times IC_{50}$ para cada caso. En el caso de **178-180** y **2** se observó un aumento de la actividad enzimática de GlcCasa dependiente de la dosis de iminoazúcar. Es interesante destacar que **2** muestra un incremento de actividad significativo a una concentración de tan sólo 1.5 nM. En cambio, el derivado **5**, así como el derivado de referencia **MZ21**, disminuyó la actividad enzimática del 31% al 25% al aumentar la concentración de $1 \times IC_{50}$ a $10 \times IC_{50}$. En el caso del derivado de referencia **MZ21** el aumento de concentración provocó una disminución de la actividad enzimática, lo que implica que a altas concentraciones tiene lugar una competencia entre el posible efecto chaperona y la inhibición enzimática en fibroblastos humanos sanos (Figura 3.13).

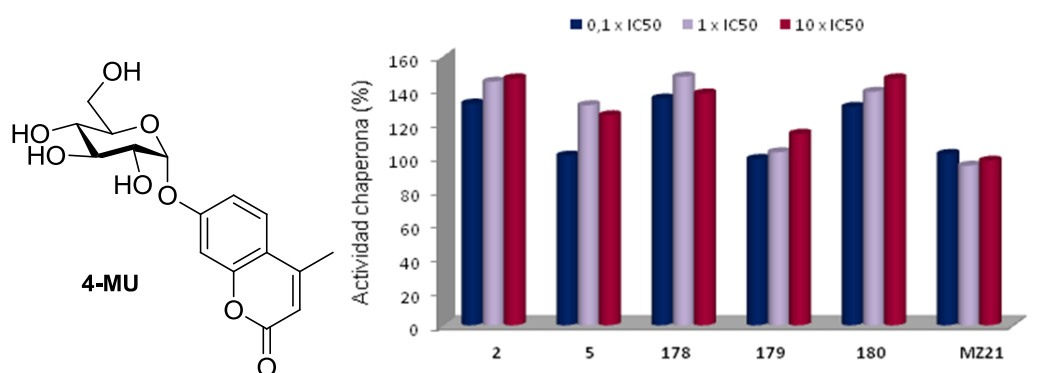


Figura 3.13. Estructura de 4-MU y efecto sobre la actividad de GlcCasa de los derivados seleccionados a diferentes concentraciones en fibroblastos humanos sanos. Valores referidos a la actividad enzimática de GlcCasa en ausencia de iminoazúcar como 100%.

A continuación, se evaluó *in vivo* el aumento de la actividad enzimática de la enzima en presencia de concentraciones crecientes de los iminoazúcares empleando células intactas usando 5'-pentafluorobenzoilaminofluorescein-di-β-D-glucoside (FDG) como sustrato (Figura 3.14).

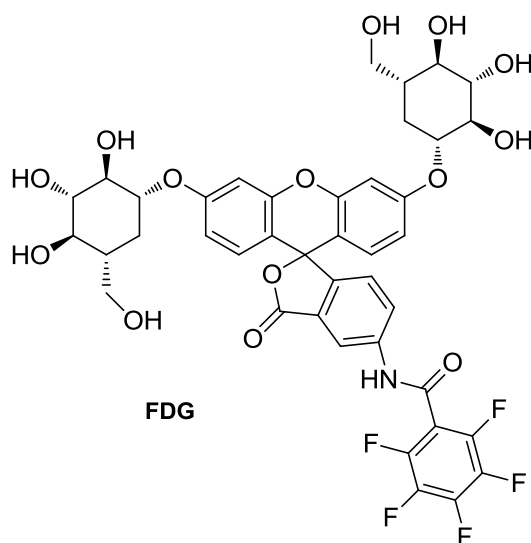


Figura 3.14. Estructura de FDG.

Los resultados obtenidos indicaron una disminución de la actividad enzimática de GlcCasa en células intactas al aumentar la concentración de los iminoazúcares. En el caso de **5**, empleando una concentración de $0.1 \times IC_{50}$, se produjo un aumento de la actividad enzimática del 1% y un aumento de la concentración hasta 10 veces IC_{50} redujo la actividad enzimática hasta el 22%, lo que indica que la competencia entre la estabilización de la enzima y la inhibición enzimática es desfavorable. En el caso de los derivados **180** y **2**, la actividad enzimática disminuyó moderadamente al aumentar la concentración. En el caso del compuesto de referencia, **MZ21**, el aumento de la concentración disminuyó drásticamente la actividad enzimática de GlcCasa hasta un 22% del valor inicial (Figura 3.15).

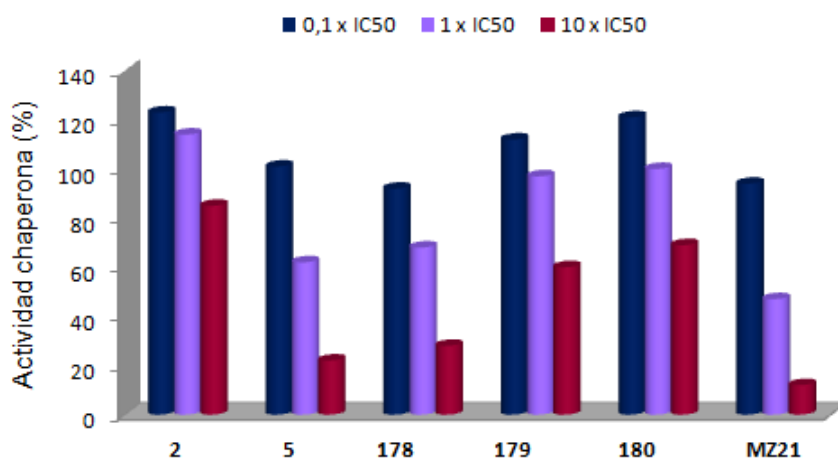


Figura 3.15. Efecto *in vivo* de los derivados seleccionados de DNJ sobre la actividad de GlcCasa a diferentes concentraciones de iminoazúcar (0.1 - $10 \times IC_{50}$) en células intactas. Valores referidos a la actividad enzimática de GlcCasa en ausencia de iminoazúcar como 100%.

Posteriormente, se determinó la actividad chaperona *in vivo* de los derivados seleccionados en células intactas empleando una sonda de actividad específica para moléculas de GlcCasa, desarrollada por los grupos de Aerts y Overkleeft, que permite la visualización de la enzima lisosomal activa.¹⁶ Este estudio permitirá determinar

diferencias entre actividad inhibitoria (que inactivará la enzima) y actividad chaperona para los diferentes glicomiméticos. La sonda ultrasensible **MDW941** (Figura 3.16) de moléculas de GlcCasa activas está constituida por una unidad de conduritol B epóxido unida, mediante un anillo de triazol y un espaciador, a un fluoróforo basado en un átomo de boro unido a dos anillos de pirrol (BODIPY). Se comporta como un inhibidor irreversible muy potente de la GlcCasa (0.008 μM) y muestra muy buena capacidad de penetrabilidad celular.

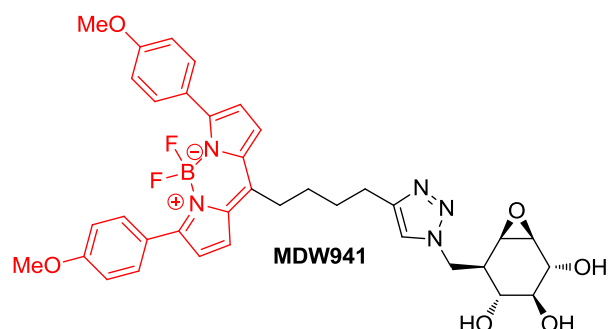


Figura 3.16. Estructura del marcador ultrasensible **MDW941** desarrollado por Aerst.

En presencia de un exceso de la sonda (100 nM), la chaperona es completamente desplazada del sitio activo y puede determinarse la cantidad total de proteína útil producida por la chaperona. Por el contrario, si se utiliza un defecto de la sonda (1 nM), marcaremos sólo una proporción de proteína activa que será tanto mayor cuanto más reversible sea el proceso de unión de la chaperona al sitio activo; es decir, cuanto mejor sea la relación entre actividad chaperona y actividad inhibitoria (Figura 3.17).

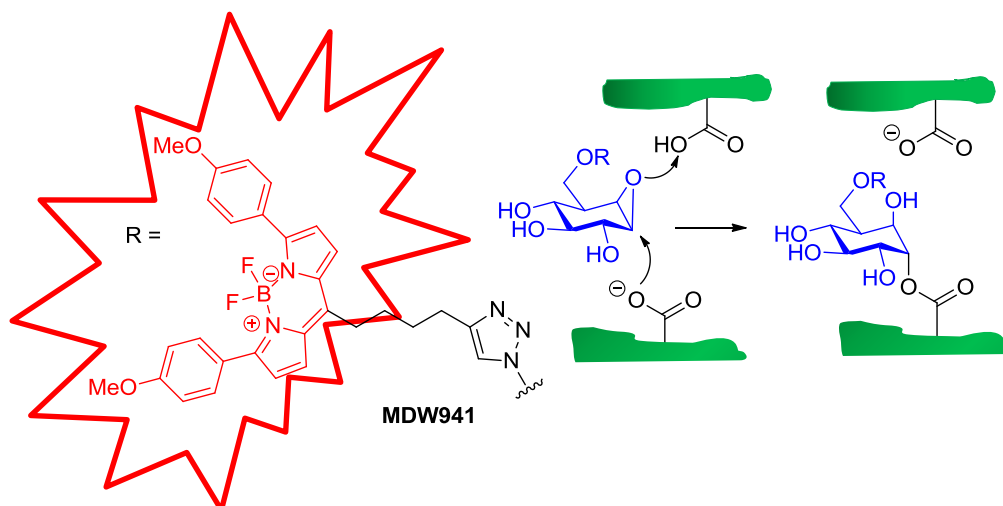


Figura 3.17. Representación de la interacción irreversible entre el marcador ultrasensible MDW941 y la enzima mediante la apertura del epóxido por el carboxilato del sitio activo y formación del éster.

Las gráficas 3.18 y 3.19 recogen los resultados obtenidos en presencia de la sonda considerando como 100% la actividad enzimática de las GlcCsa en ausencia de iminoazúcar. En presencia de un exceso de la sonda, se observa un incremento de la actividad dependiente de la concentración de iminoazúcar en todos los casos (Figura 3.18). Por el contrario, se observó una disminución de la actividad enzimática de GlcCsa en células intactas al aumentar la concentración de los iminoazúcares cuando la sonda se encuentra en defecto (Figura 3.19). Una disminución más acusada indica que el efecto inhibidor domina sobre la capacidad como chaperona. De los resultados mostrados en las Figuras 3.18 y 3.19, se deduce que los derivados **180** y **2** son los que presentan un mayor potencial como PCs, por lo que se llevó a cabo un estudio de su actividad utilizando fibroblastos humanos normales y mutantes N370S/ N370S procedentes de dos líneas celulares.

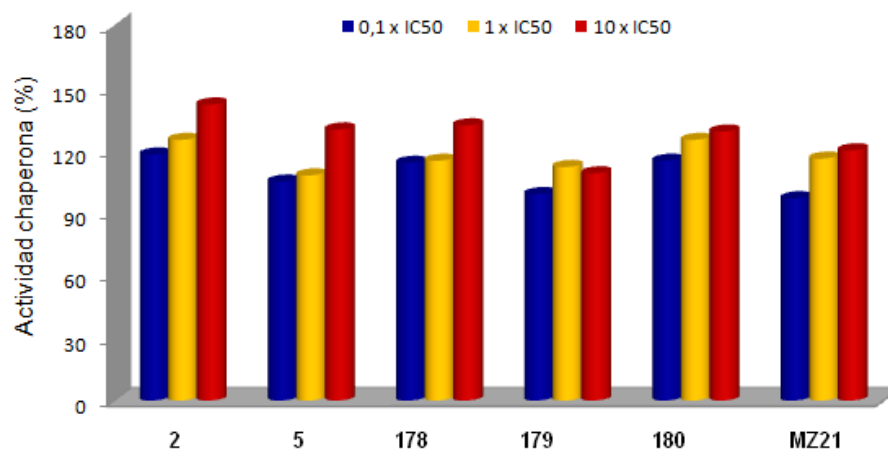


Figura 3.18. Efecto *in vivo* sobre la actividad de GlcCasa en células marcadas con un exceso (100 nM) de MDW941.

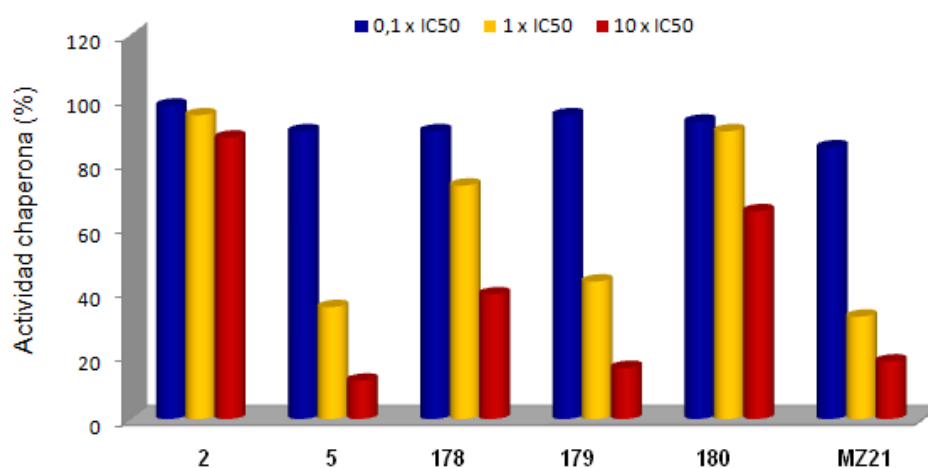


Figura 3.19. Efecto *in vivo* sobre la actividad de GlcCasa en células marcadas con un defecto (1 nM) de MDW941.

En las Figuras 3.20, 3.21 y 3.22 se recogen los datos de la evaluación como PCs de los iminoazúcares **180** y **2** en fibroblastos humanos normales (Figura 3.20) y mutantes (N370S/ N370S) procedentes de dos líneas celulares diferentes (MED91AD y 185FF02, Figuras 3.21 y 3.22). Los fibroblastos fueron incubados durante 4 días en presencia o en

ausencia de los iminoazúcares y posteriormente se determinó la actividad enzimática de GlcCasa *in vitro* usando lisados de fibroblastos y empleando 4-MU como sustrato o *in vivo* en células intactas y empleando FDG como sustrato, considerando en ambos casos como 100% la actividad enzimática de las GlcCasa en ausencia de iminoazúcar.

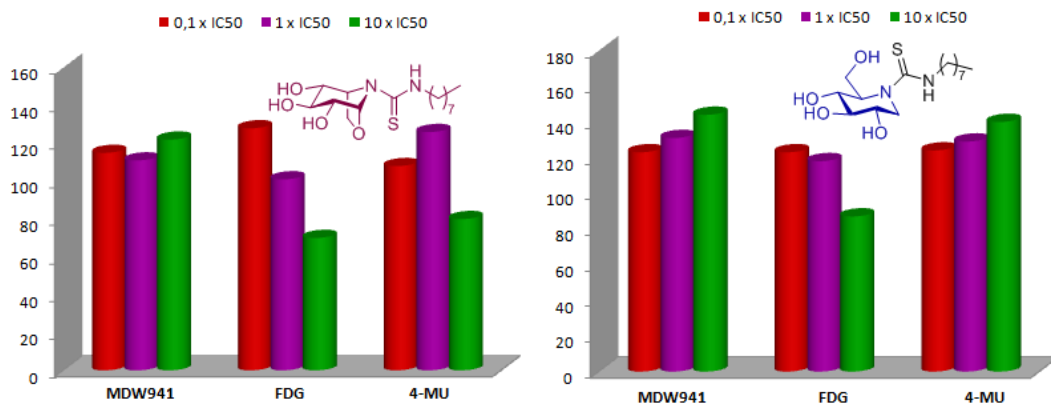


Figura 3.20. Efecto de los iminoazúcares **180** y **2** sobre la actividad de GlcCasa en fibroblastos humanos normales.

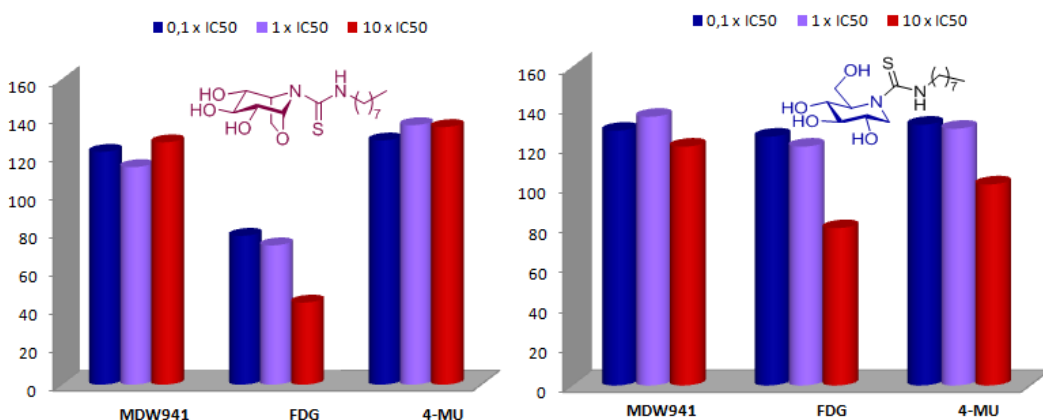


Tabla 3.21. Efecto de los iminoazúcares **180** y **2** sobre la actividad de GlcCasa en fibroblastos humanos mutantes N370S/ N370S (línea celular 185FF02).

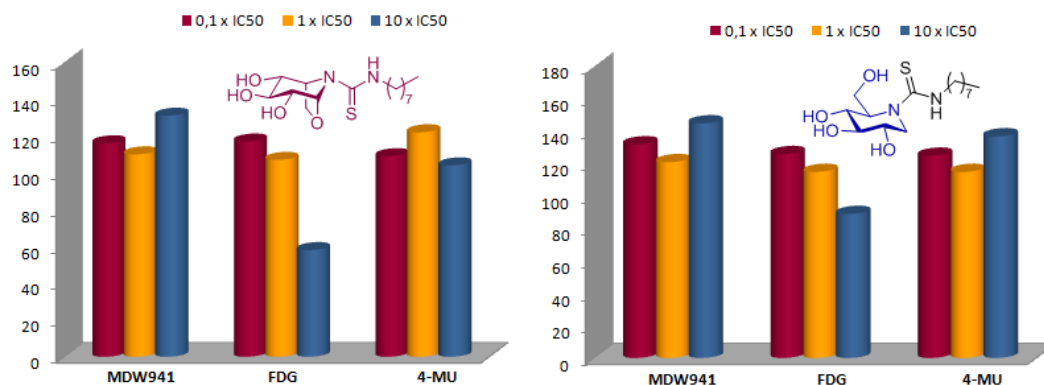


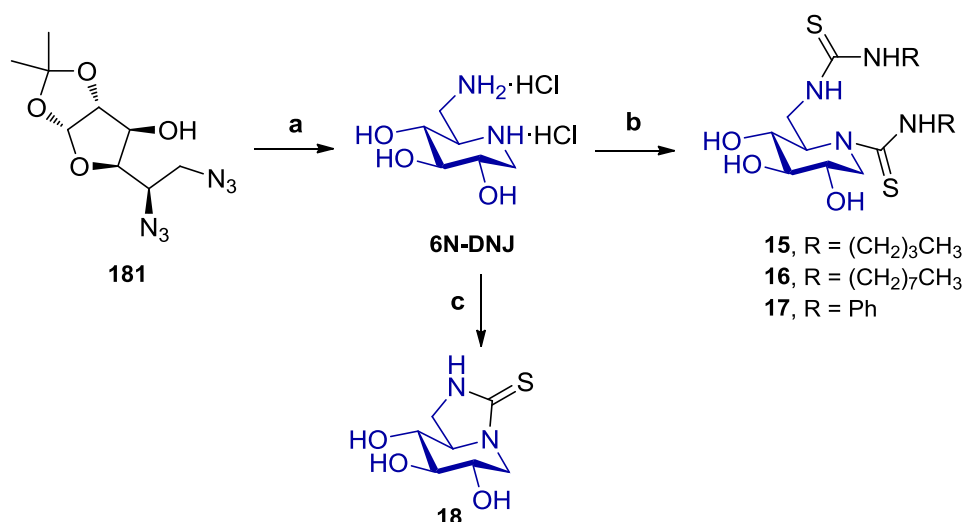
Figura 3.22. Efecto de los iminoazúcares **180** y **2** sobre la actividad de GlcCasa en fibroblastos humanos mutantes N370S/ N370S (línea celular 185FF02).

En este apartado se ha discutido el efecto sobre la actividad *in vitro* e *in vivo* de derivados de configuración D-*gluco* sobre diversas enzimas (GCS, GlcCasa y GBA2) involucradas en el metabolismo de la GlcCer. Los derivados monocíclicos sintetizados, en concreto el derivado de DNJ **2**, mostraron una elevada especificidad por la GlcCasa junto a una inhibición competitiva y reversible por dicha enzima, como así lo mostraron los ensayos enzimáticos empleando el marcador ultrasensible **MDW941**. Estos estudios de determinación del incremento de la actividad residual de GlcCasa mutantes indicaron que estos compuestos podrían, a bajas concentraciones, estabilizar la GlcCasa. La visualización de las moléculas activas de GlcCasa empleando el marcador **MDW941** puso de manifiesto el comportamiento como PC de los derivados **180** y **2**, tanto en fibroblastos humanos sanos como mutantes, lo que permitiría controlar los síntomas derivados de GD. Aunque no disponemos aún de los correspondientes datos, los derivados de L-DIJ son susceptibles de comportarse como inhibidores de GCS, de acuerdo con los antecedentes de la bibliografía, lo que nos permitiría disponer de inhibidores selectivos para las dos enzimas claves involucradas en la biosíntesis de la GlcCer y, por tanto, en las patologías asociadas a GD.

3.3. Preparación de iminoazúcares sp^2 derivados de 6N-DNJ y evaluación como inhibidores de glicosidasas.

El conjunto de resultados recogidos en el apartado anterior nos ha permitido identificar a los iminoazúcares sp^2 derivados de DNJ con función *N*-tioureido como compuestos que presentan una respuesta positiva en los estudios como PCs en células Gaucher. Pese a mostrar resultados prometedores, el efecto de dichos derivados es moderado en las líneas celulares estudiadas. Dado el efecto favorable de la presencia de una función *N*-tioureido sobre la actividad enzimática de GlcCasa, nos hemos planteado el diseño y síntesis de iminoazúcares sp^2 derivados de 6-amino-1,6-didesoxinojirimicina (6N-DNJ) que posean dos funciones *N*-tioureido con objeto de potenciar el efecto chaperona en células Gaucher.

Para la preparación de 6N-DNJ, se ha propuesto una síntesis novedosa a partir de 5,6-diazido-5,6-didesoxi-1,2-*O*-isopropilidén- α -D-glucofuranosa **181** sintetizada previamente en nuestro grupo de investigación.¹⁷ La hidrólisis del grupo isopropilideno bajo condiciones ácidas empleando TFA-H₂O seguida de hidrogenación catalítica bajo 25 bares de presión dio lugar a la diamina, la cual cicló espontáneamente originando exclusivamente la piperidina 6N-DNJ con un 63% de rendimiento global. Durante la reacción, no se observó la formación de otros *N*-heterociclos. Como se muestra en el Esquema 3.4, las reacciones de acoplamiento de la diamina 6N-DNJ con los isotiocianatos correspondientes transcurrieron satisfactoriamente en piridina empleando Et₃N como catalizador, generando los *N,N*-ditioureidos **15-17** derivados de 6N-DNJ con excelentes rendimientos. Además, también se preparó la tiourea cíclica **18** derivada de 6N-DNJ mediante el tratamiento de 6N-DNJ con CS₂ en DMF con un rendimiento de (81%) La estrategia sintética desarrollada ha permitido introducir diversidad molecular con bajo coste sintético, siendo posible el estudio de la influencia de la naturaleza del sustituyente pseudoaglicónico en la interacción con GlcCasa.



Esquema 3.4. Síntesis de los derivados *N,N*-ditioureidos de 6N-DNJ. Reactivos y condiciones: a, 1. TFA-H₂O 9:1, 0 °C, 2 h; 2. H₂, Pd/C, dioxano-H₂O 4:1, 25 bar, t.a., 48 h, 63% (dos etapas); b, RNCS, py, Et₃N, t.a., 18 h, 72-78%; c, CS₂, DMF, DCC, t.a., 1 h, 81%.

Los espectros de ¹H y de ¹³C RMN así como los espectros de masas en modo ESI confirmaron las estructuras de los nuevos derivados. Al igual que para los derivados monocíclicos de DNJ con función *N*-tioureido, los espectros de ¹H RMN indicaron valores de constantes de acoplamiento alrededor del anillo de piperidina que sugieren una conformación de silla ⁴C₁ (Figura 3.23). De igual modo, en los espectros de ¹³C RMN se observan dos señales alrededor de 185-190 ppm correspondientes a los carbonos tiocarbónílicos (CS) y otra señal, más desapantallada que respecto a los derivados análogos de DNJ, sobre 45 ppm correspondiente a C-6 unido a nitrógeno.

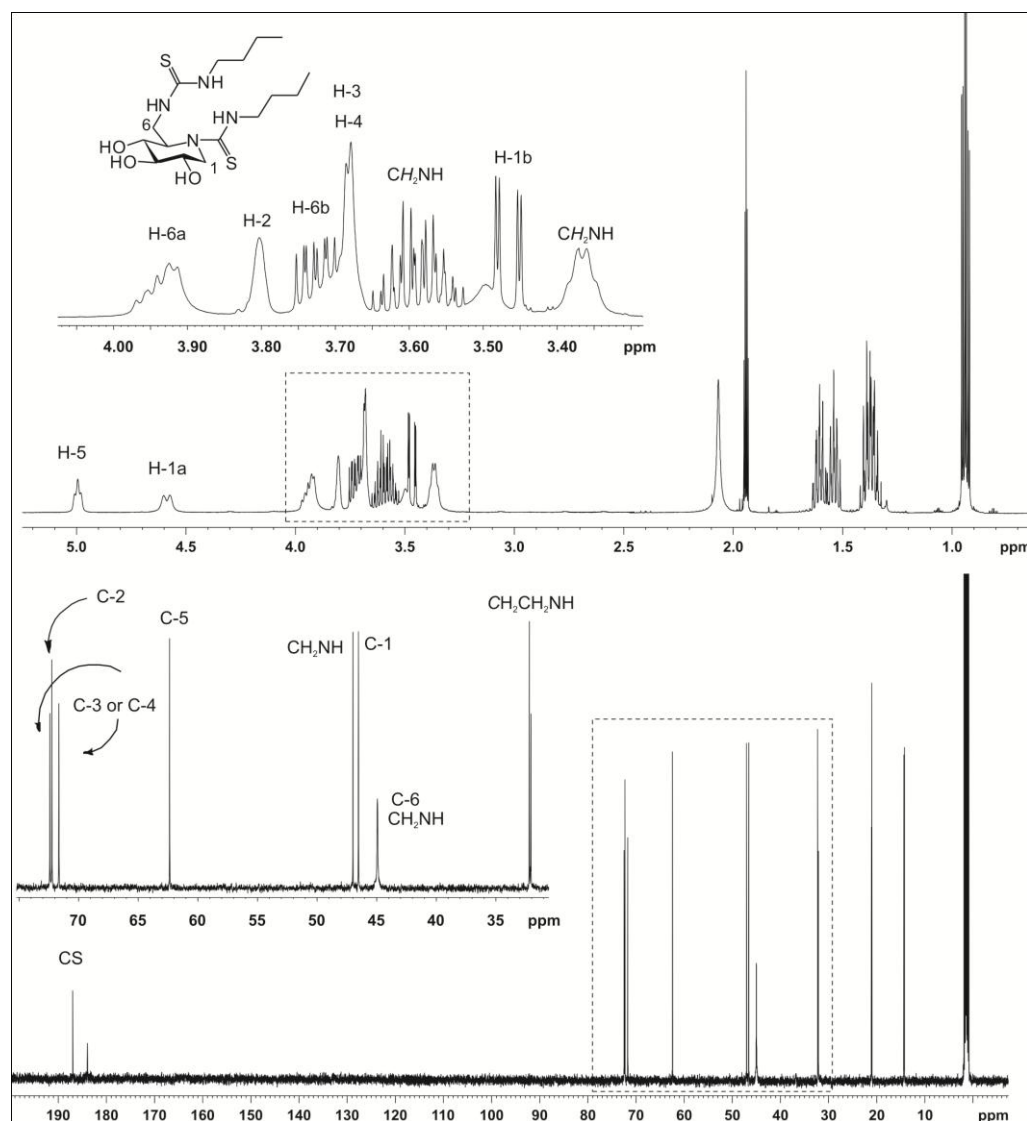


Figura 3.23. Espectros de ^1H y ^{13}C RMN (500 MHz, 125.7 MHz, 328 K, CD_3CN) de **15**.

La evaluación como inhibidores de los nuevos derivados se llevó a cabo en nuestro laboratorio frente a un panel de glicosidasas comerciales y los valores de K_i se muestran en la Tabla 3.4. En el estudio de la actividad como inhibidores se incluyó la enzima α -fucosidasa debido a estudios previos que identificaban el derivado 6N-DNJ

como inhibidor moderado de dicha enzima.¹⁸ Los derivados **15-17** no mostraron actividad biológica frente a α -fucosidasa. En cambio, se comportaron como inhibidores selectivos de β -Glcasa de almendra, siendo inactivos frente a enzimas que presentan actividad α -Glcasa (levadura y amiloglucosidasa) y actividad α - y β -Galasa (grano de café y *E. Coli*, respectivamente). El derivado más potente como inhibidor de β -Glcasa de almendra de esta serie de compuestos fue **15**, que incorpora dos cadenas de *n*-butilo, presentando un valor de K_i 6.8 μ M.

Tabla 3.4. Comparación de la actividad como inhibidores de glicosidasas (K_i , μ M) para los derivados de 6N-DNJ.^a

Enzimas	6N-DNJ	15	16	17
α-Glcasa				
Levadura	886	880	n.i.	618
Amiloglucasa	262	n.i.	n.i.	n.i.
β-Glcasa				
Hígado de buey	n.i.	144	54	226
Almendra pH 7.3	858	6.8	58	96
Almendra pH 5.5	319	29	89	36
Naringinasa	215	35	20	14
β-Galasa				
<i>Escherichia coli</i>	381	n.i.	n.i.	n.i.

n. i. No se detectó inhibición. ^aNinguno de los compuestos mostró inhibición frente a la enzima isomaltasa (levadura), α -Galasa (café), α -Manasa (judía Jack), β -Manasa (*Helix pomatia*) y α -fucosidasa (riñón de buey).

Actualmente, los derivados de 6N-DNJ se encuentran bajo desarrollo y evaluación como PCs para GD en el laboratorio del Prof. Aerst.

-
- ¹ G. Horne, F. X. Wilson, J. Tinsley, D. H. Willians, R. Storer, *Drug Discovery Today* **2011**, *16*, 107-118.
- ² P. Compain, O. R. Martin, C. Boucheron, G. Godin, L. Yu, K. Ikeda, N. Asano, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1356-1359.
- ³ a) A. Trapero, P. González-Bulnes, T. D. Butters, A. Llebaria, *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 4479-4488; b) A. Trapero, A. Llebaria, *ACS Med. Chem. Lett.* **2011**, *2*, 614-619.
- ⁴ a) J. L. Jiménez Blanco, V. M. Díaz Pérez, C. Ortiz Mellet, J. Fuentes, J. M. García Fernández, J. C. Díaz Arribas, F. J. Cañada, *Chem. Commun.* **1997**, 1969-1970; b) M. I. García-Moreno, P. Díaz-Pérez, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, *Chem. Commun.* **2002**, 848-849; c) M. I. García-Moreno, P. Díaz-Pérez, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 8890-8901; d) M. I. García-Moreno, D. Rodríguez-Lucena, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 3578-3581; e) M. Aguilar, P. Díaz-Pérez, M. I. García-Moreno, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 1995-1998; f) M. Aguilar-Moncayo, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, M. I. García-Moreno, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 3595-3598; g) E. M. Sánchez-Fernández, R. Rísquez-Cuadro, M. Aguilar-Moncayo, M. I. García-Moreno, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 3306-3309; h) E. M. Sánchez-Fernández, R. Rísquez-Cuadro, M. Chasseraud, A. Ahidouch, C. Ortiz Mellet, H. Ouadid-Ahidouch, J. M. García Fernández, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 5328-5330; i) M. Aguilar-Moncayo, M. I. García-Moreno, A. E. Stütz, J. M. García Fernández, T. M. Wrodnigg, C. Ortiz Mellet, *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 7439-7445; j) M. Aguilar-Moncayo, P. Díaz-Pérez, J. M. García Fernández, C. Ortiz Mellet, M. I. García-Moreno, *Tetrahedron* **2012**, *68*, 681-689; k) E. M. Sánchez-Fernández, R. Rísquez-Cuadro, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, P. M. Nieto, J. Angulo, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 8527-8539.
- ⁵ Z. Luan, K. Higaki, M. Aguilar-Moncayo, H. Ninomiya, K. Ohno, M. I. García-Moreno, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, Y. Suzuki, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 2780-2782.

-
- ⁶ a) Z. Luan, K. Higaki, M. Aguilar-Moncayo, L. Li, H. Ninomiya, E. Nanba, K. Ohno, M. I. García-Moreno, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, Y. Suzuki, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 2453-2464; b) G. Tiscornia, E. L. Vivas, L. Matalonga, I. Berniakovich, M. Barragán Monasterio, C. Eguizábal, L. Gort, F. González, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, A. Ribes, A. Veiga, J. C. Izpisua Belmonte, *Hum. Mol. Genet.* **2013**, *22*, 633-645; c) T. Takai, K. Higaki, M. Aguilar-Moncayo, T. Mena-Barragán, Y. Hirano, K. Yura, L. Yu, H. Ninomiya, M. I. García-Moreno, Y. Sakakibara, K. Ohno, E. Nanba, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, Y. Suzuki, *Mol. Ther.* **2013**, *21*, 526-532.
- ⁷ a) I. Bendikov-Bar, I. Ron, M. Filocamo, M. Horowitz, *Blood Cells Mol. Dis.* **2011**, *46*, 4-10; b) J. M. Benito, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, *Expert Opin. Ther. Patents* **2011**, *21*, 885-903.
- ⁸ Z. Luan, K. Higaki, M. Aguilar-Moncayo, H. Ninomiya, K. Ohno, M. I. García-Moreno, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, Y. Suzuki, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 2780-2792.
- ⁹ B. Brumshtein, M. Aguilar-Moncayo, M. I. García-Moreno, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, I. Silman, Y. Shaaltiel, D. Aviezer, J. L. Sussman, A. Futerman, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 1480-1485.
- ¹⁰ A. R. Sawkar, W. C. Cheng, E. Beutler, C. H. Wong, W. E. Balch, J. W. Kelly, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 15428-15433.
- ¹¹ a) P. Compain, O. R. Martin, C. Boucheron, G. Godin, L. Yu, K. Ikeda, N. Asano, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1356-1359; b) L. Yu, K. Ikeda, A. Kato, I. Adachi, G. Godin, P. Compain, O. R. Martin, N. Asano, *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 7736-7744.
- ¹² B. Brumshtein, H. M. Greenblatt, T. D. Butters, Y. Shaaltiel, D. Aviezer, I. Silman, A. H. Futerman, J. L. Sussman, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 29052-29058.
- ¹³ A. Ghisaidoobe, P. Bikker, A. C. J. de Bruijn, F. D. Godschalk, E. Rogaar, M. C. Guijt, P. Hagens, J. M. Halma, S. M. van't Hart, S. B. Luitjens, V. H. S. van Rixel, M. Wijzenbroek, T. Zweegers, W. E. Donker-Koopman, A. Strijland, R. Boot, G. van der

Marel, H. S. Overkleeft, J. M. F. G. Aerts, R. J. B. H. N. van den Berg, *ACS Med. Chem. Lett.* **2011**, 2, 119-123.

¹⁴ K. Dax, B. Gaigg, V. Grassberger, B. Kölblinger, A. E. Stütz, *J. Carbohydr. Chem.* **1990**, 9, 479-499.

¹⁵ P. Alfonso, V. Andreu, A. Pino-Angeles, A. A. Moya-García, M. I. García-Moreno, J. C. Rodríguez-Rey, F. Sánchez-Jiménez, M. Pocoví, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, P. Giraldo, *ChemBioChem* **2013**, 14, 943-949.

¹⁶ M. D. Witte, W. W. Kallemeijn, J. Aten, K.-Y. Li, A. Strijland, W. E. Donker-Koopman, A. M. C. H. Van Der Nieuwendijk, B. Bleijlevens, G. Kramer, B. I. Florea, B. Hooibrink, C. E. M. Hollak, K. Ottenhoff, R. G. Boolt, G. A. Van Der Marel, H. S. Overkleeft, J. M. F. G. Aerts, *Nat. Chem. Biol.* **2010**, 6, 907-913.

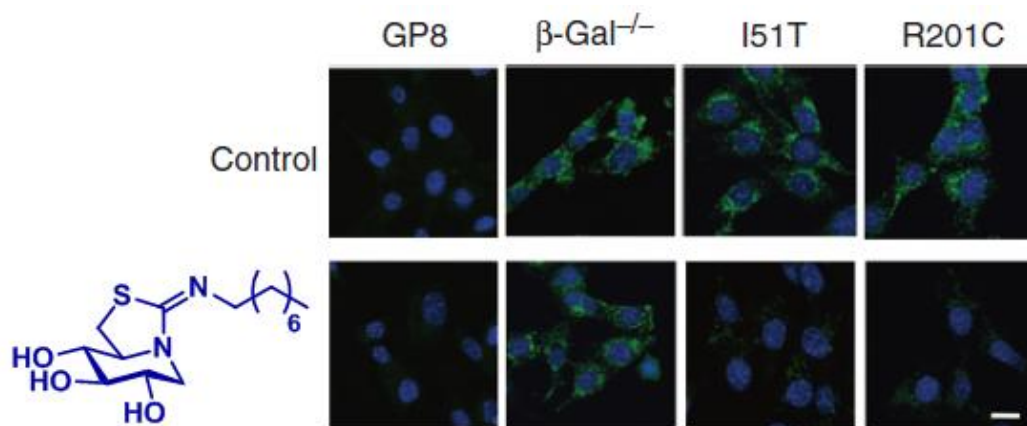
¹⁷ V. M. Díaz Pérez, M. I. García Moreno, C. Ortiz Mellet, J. Fuentes, J. C. Díaz Arribas, F. J. Cañada, J. M. García Fernández, *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 136-143.

¹⁸ T. Tite, M.-C. Lallemand, E. Poupon, N. Kunesch, F. Tillequin, C. Gravier-Pelletier, Y. Le Merrer, H.-P. Husson, *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, 12, 5091-5097.

Capítulo 4

Síntesis de Iminoazúcares sp^2 derivados de DGJ como Chaperonas Farmacológicas para las Enfermedades de Fabry y Gangliosidosis GM_1

Abstract. We report a generic approach for the design of selective glycosidase binding molecules by exploiting non-glyconic interactions with conformationally locked sp^2 -iminosugars. The strategy has been successfully applied to the development of small molecule probes that were shown to be competitive inhibitors of either human lysosomal α -galactosidase (α -Gal) or β -galactosidase (β -Gal) with high affinity and specificity. Selected compounds were profiled as potent pharmacological chaperones for several mutant lysosomal α - and β -Gal associated to Fabry disease and GM_1 gangliosidosis respectively.



4. Síntesis de derivados de DGJ como chaperonas farmacológicas para la enfermedad de Fabry y la gangliosidosis GM₁.

El primer ejemplo del uso de una chaperona farmacológica como terapia para el tratamiento de enfermedades metabólicas genéticas corresponde al iminoazúcar DGJ para el tratamiento de FD.¹ En este capítulo de la Tesis se describen las investigaciones realizadas para determinar la relación entre la estructura de iminoazúcares sp² derivados de DGJ y su utilidad como PCs para FD y la gangliosidosis GM₁.

4.1. Influencia de factores conformacionales en la selectividad de iminoazúcares sp² frente a diferentes glicosidasas: hipótesis de partida.

Uno de los objetivos principales de esta Tesis Doctoral ha consistido en el diseño de inhibidores potentes y específicos de α - y β -Galasas, susceptibles de utilizarse como PCs para el tratamiento de FD y de la gangliosidosis GM₁, respectivamente. Para ello, nos hemos planteado la preparación de dos familias de iminoazúcares sp² no reductores de configuración D-galacto, derivados de DGJ, con estructura monocíclicas y bicíclicas. En los primeros el nitrógeno endocíclico pertenece a un grupo tioureido, en tanto que en los segundos forma parte de un anillo de iminotiazolidina.

La decisión de centrarnos en estos dos tipos de sistemas se basa en los resultados obtenidos anteriormente para derivados de iminoazúcares sp² reductores frente a la GlcCasa y en el análisis de los datos estructurales disponibles para las α - y β -Galasas. Estas dos enzimas muestran bolsillos hidrofóbicos que serían accesibles a sustituyentes situados sobre el grupo pseudoamida, pero con una orientación que no sería accesible por razones estéricas cuando el hidroxilo pseudoanomérico está presente. En principio, el grupo hidroxilo pseudoanomérico no está implicado directamente en interacciones mediante enlaces de hidrógeno con residuos de aminoácidos de la enzima, por lo que no es probable que su eliminación conlleve una pérdida de estabilización del complejo

enzima-inhibidor. De hecho, se evitaría el coste energético asociado a la inversión de la configuración que probablemente tendría lugar en el sitio activo de la β -Galasa, por analogía a lo observado para la GlcCasa.² En estas condiciones, la configuración más estable termodinámicamente en iminoazúcares monocíclicos con función tiourea sería la *E*, *Z*, en tanto que en los derivados bicíclicos la configuración preferida del grupo imino exocíclico sería *E*. Ésto implica un cambio de orientación del sustituyente pseudoaglicónico que favorecería la unión de los nuevos derivados a α - y β -Galasas, respectivamente³ (Figura 4.1).

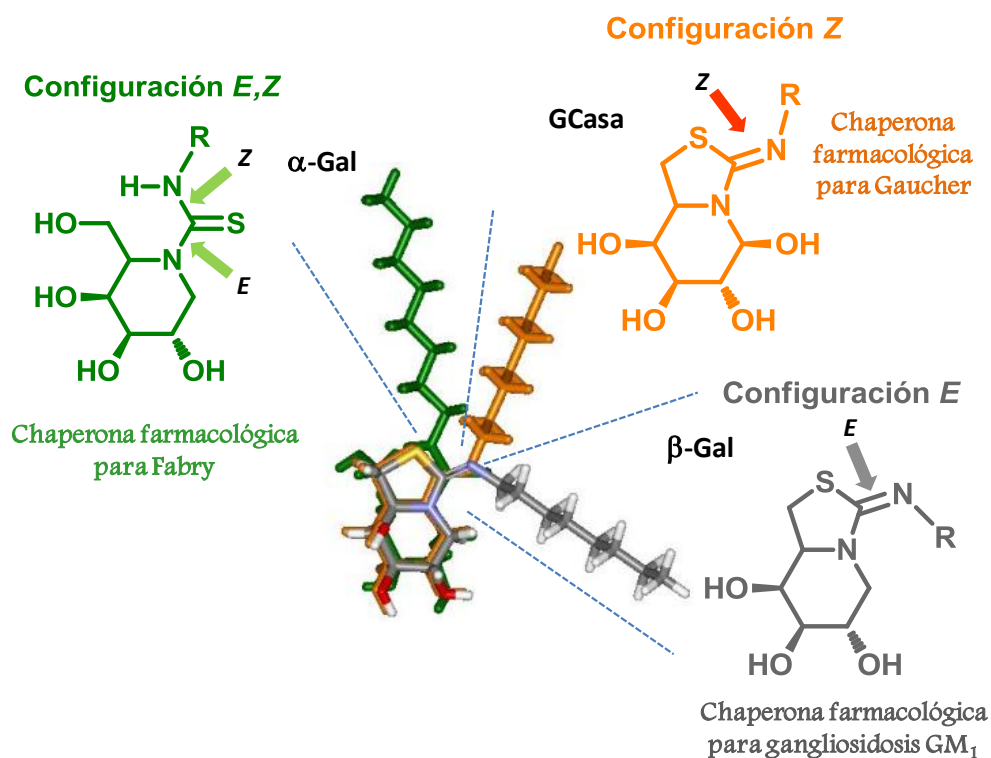
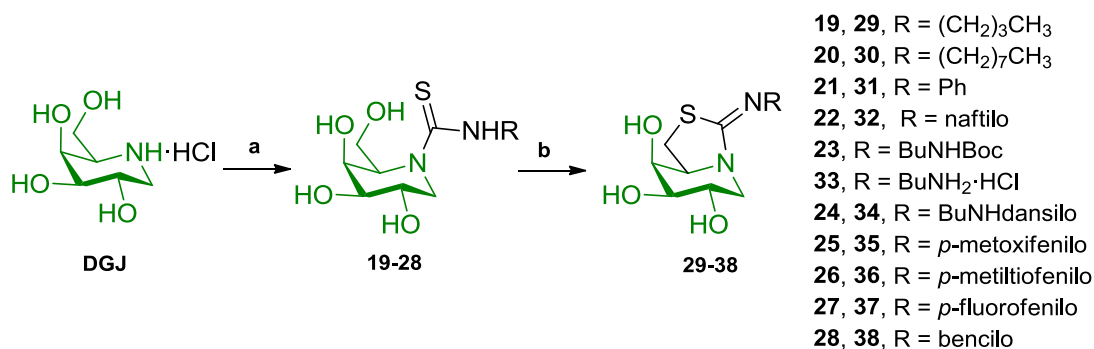


Figura 4.1. Análisis configuracional-conformacional de la interacción del sustituyente pseudoaglicónico con los bolsillos hidrofóbicos de las glicosidasas lisosomales.

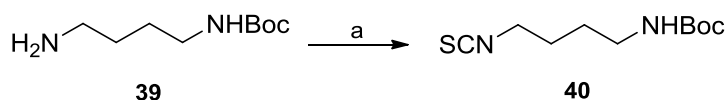
4.2. Preparación de derivados monocíclicos y bicíclicos de DGJ y evaluación de su capacidad como inhibidores de glicosidasas.

Para la preparación de los derivados monocíclicos con función tiourea se utilizó el acoplamiento del hidrocloreuro de DGJ⁴ con los correspondientes isotiocianatos, en piridina y en presencia de Et₃N como catalizador, obteniéndose una serie de derivados (**19-28**), con rendimientos desde moderados a excelentes (47-94%). El desplazamiento espontáneo del grupo hidroxilo primario (OH-6) por el átomo de azufre del grupo tiocarbonilo de las tioureas tuvo lugar a temperatura ambiente en metanol por acidificación hasta pH 1 con HCl concentrado y condujo a los derivados bicíclicos de DGJ (**29-38**) (Esquema 4.1).



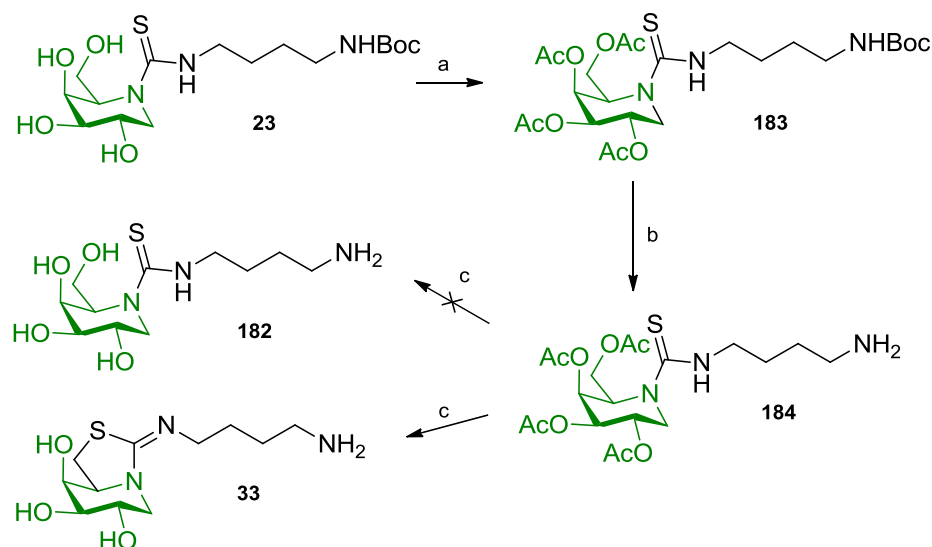
Esquema 4.1. Preparación de derivados mono y bicíclicos de DGJ no reductores. Reactivos y condiciones: a, RNCS, py, Et₃N, t.a., 18 h, 47-94%; b, HCl conc., MeOH, t.a., 12 h, 45-99%.

La incorporación de algunos sustituyentes ha requerido la preparación previa de los isotiocianatos precursores. Así, en el caso del derivado **23**, el isotiocianato correspondiente **40** se obtuvo con rendimiento cuantitativo mediante reacción de isotiocianación de la *N*-(*terc*-butoxicarbonil)-1,4-butanodiamina comercial empleando tiofosgeno en una mezcla de diclorometano-agua 1:1 (Esquema 4.2).



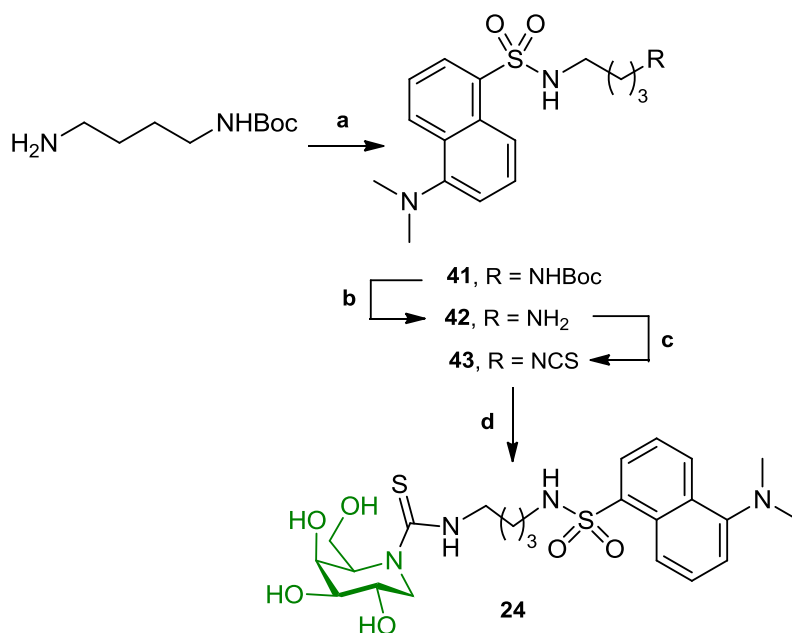
Esquema 4.2. Preparación del isotiocianato precursor **40**. Reactivos y condiciones: a, CSCl_2 , CaCO_3 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-H}_2\text{O}$ 1:1, $0\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{t.a.}$, 3 h, cuant.

Con objeto de poder llevar a cabo estudios cinéticos de la interacción enzima-inhibidor y realizar estudios de internalización y tráfico intracelular, nos propusimos la incorporación de una sonda fluorescente (dansilo) en esta familia de compuestos. Como estrategia de síntesis, nos planteamos inicialmente el acoplamiento del derivado monocíclico **182** con cloruro de dansilo. Para su preparación, partimos del derivado **23** y se procedió a la protección de los grupos hidroxilos en forma de ésteres para evitar la ciclación intramolecular en la etapa de desprotección. La acetilación del derivado **23** (\rightarrow **183**) con anhídrido acético en piridina, seguida de la hidrólisis del grupo carbamato en condiciones ácidas empleando $\text{TFA-H}_2\text{O}$ 1:10 condujo a la amina **184** con rendimiento prácticamente cuantitativo. Sin embargo, la posterior desacetilación empleando las condiciones de Zemplén produjo el desplazamiento nucleófilo del hidroxilo primario (OH-6) por el átomo de azufre, originando el derivado bicíclico **33** en vez de **182** objetivo (Esquema 4.3).



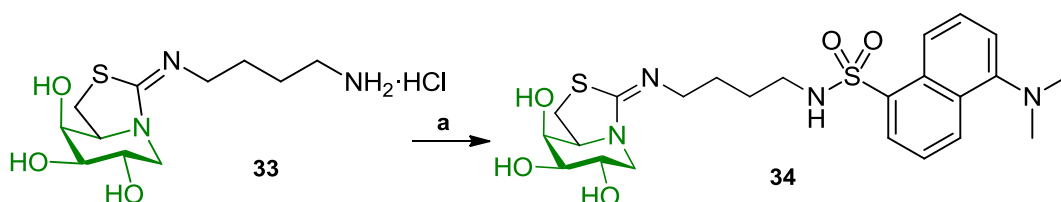
Esquema 4.3. Ensayo de preparación del derivado **182**. Reactivos y condiciones: a, Ac_2O , py, 0°C , 24 h, 98 %; b, TFA- H_2O 1:10, 0°C , 4 h, cuantitativo; c, MeONa 1 M, MeOH, t.a., 30 min.

A la vista de este resultado se decidió seguir una ruta alternativa que implicaba la preparación del isotiocianato **43**, que incorpora la sonda fluorescente, y su posterior acoplamiento con DGJ. El acoplamiento de *N*-(*tert*-butoxicarbonil)-1,4-butanodiamina con cloruro de dansilo en DMF y Et_3N como catalizador (\rightarrow **41**) transcurrió con un 95% de rendimiento. Tras la hidrólisis en condiciones ácidas del grupo carbamato (\rightarrow **42**), la posterior isotiocianación empleando tiofosgeno (\rightarrow **43**) y, finalmente, el acoplamiento con hidrocloreto de DGJ permitió aislar el derivado monocíclico de DGJ **24** (Esquema 4.4).



Esquema 4.4. Preparación del derivado monocíclico fluorescente de DGJ **24**. Reactivos y condiciones: a, Cloruro de dansilo, DMF, Et_3N , 0°C , 4 h, 95%; b, TFA- H_2O 1:1, 0°C , 1 h, cuantitativo; c, CaCO_3 , CSCl_2 , CH_2Cl_2 - H_2O 1:1, $0^\circ\text{C} \rightarrow \text{t.a.}$, 2 h, 81%; d, DGJ, py, Et_3N , t.a., 24 h, 47%.

La preparación del derivado bicíclico **34** etiquetado con la sonda fluorescente de dansilo se llevó a cabo por acoplamiento del grupo amino terminal de **33** con cloruro de dansilo en DMF (Esquema 4.5).



Esquema 4.5. Preparación del derivado bicíclico fluorescente de DGJ **34**. Reactivos y condiciones: a, Cloruro de dansilo, DMF, Et_3N , 0°C , 4 h, 81 %.

Los espectros de ^1H y ^{13}C RMN de los derivados obtenidos, registrados en D_2O o en MeOD, así como los espectros de masas (FAB y ESI) y los datos de análisis elemental permitieron confirmar las estructuras mono y bicíclicas. Los derivados bicíclicos presentan en el espectro de ^{13}C RMN una señal alrededor de 170-165 ppm característica del carbono imínico y otra señal sobre 28 ppm correspondiente al átomo de carbono C-6. En los derivados monocíclicos la señal del carbono imínico está ausente, encontrándose en su lugar la señal del carbono tiocarbonílico sobre 185 ppm. La señal de C-6, unido a oxígeno en lugar de a azufre, está fuertemente desplazada a campo bajo, localizándose alrededor de 60 ppm. En los espectros de ^1H RMN de los derivados bicíclicos se observa una señal entre 4.30-3.90 ppm característica de H-5 y otras señales, entre 4.00-3.30 ppm y 3.60-3.10 ppm, correspondientes a H-6a y H-6b respectivamente. Dichas señales también muestran un desplazamiento a campo bajo en los derivados monocíclicos, encontrándose una señal entre 4.84-4.80 ppm propia de H-5 y las señales H-6a y H-6b entre 4.04-4.02 ppm y 3.93-3.90 ppm, respectivamente. En los espectros de ^1H RMN y de ^{13}C RMN de los derivados de dansilo (**24** y **34**) y naftilo (**22** y **32**) se observan además las señales correspondientes en la zona aromática, entre 7.28-8.60 ppm (^1H RMN) y 115.2-153.2 ppm (^{13}C RMN) para la sonda fluorescente y entre 7.02-7.99 ppm (^1H RMN) y 118.9-147.7 ppm (^{13}C RMN) para el grupo naftilo. Los valores de las constantes de acoplamiento alrededor del anillo de piperidina sugieren una conformación de silla $^4\text{C}_1$ tanto de los derivados monocíclicos como de los bicíclicos (Figuras 4.2 y 4.3). En los espectros de masas en modo FAB o ESI se observó en todos los casos las señales correspondientes a los iones pseudomoleculares $[\text{M} + \text{H}]^+$ y $[\text{M} + \text{Na}]^+$.

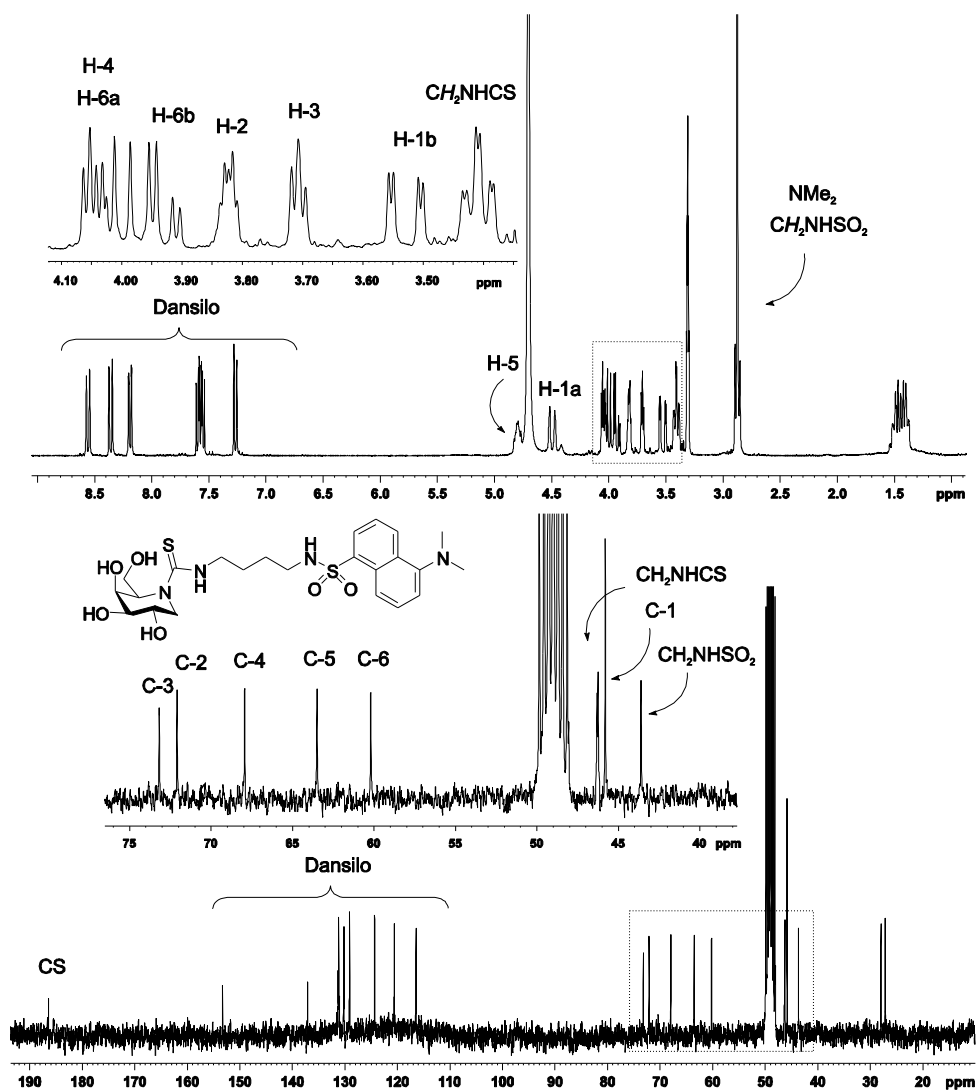


Figura 4.2. Espectros de ^1H y ^{13}C RMN (300 MHz, 75.5 MHz, CD_3OD , 313 K) de 24.

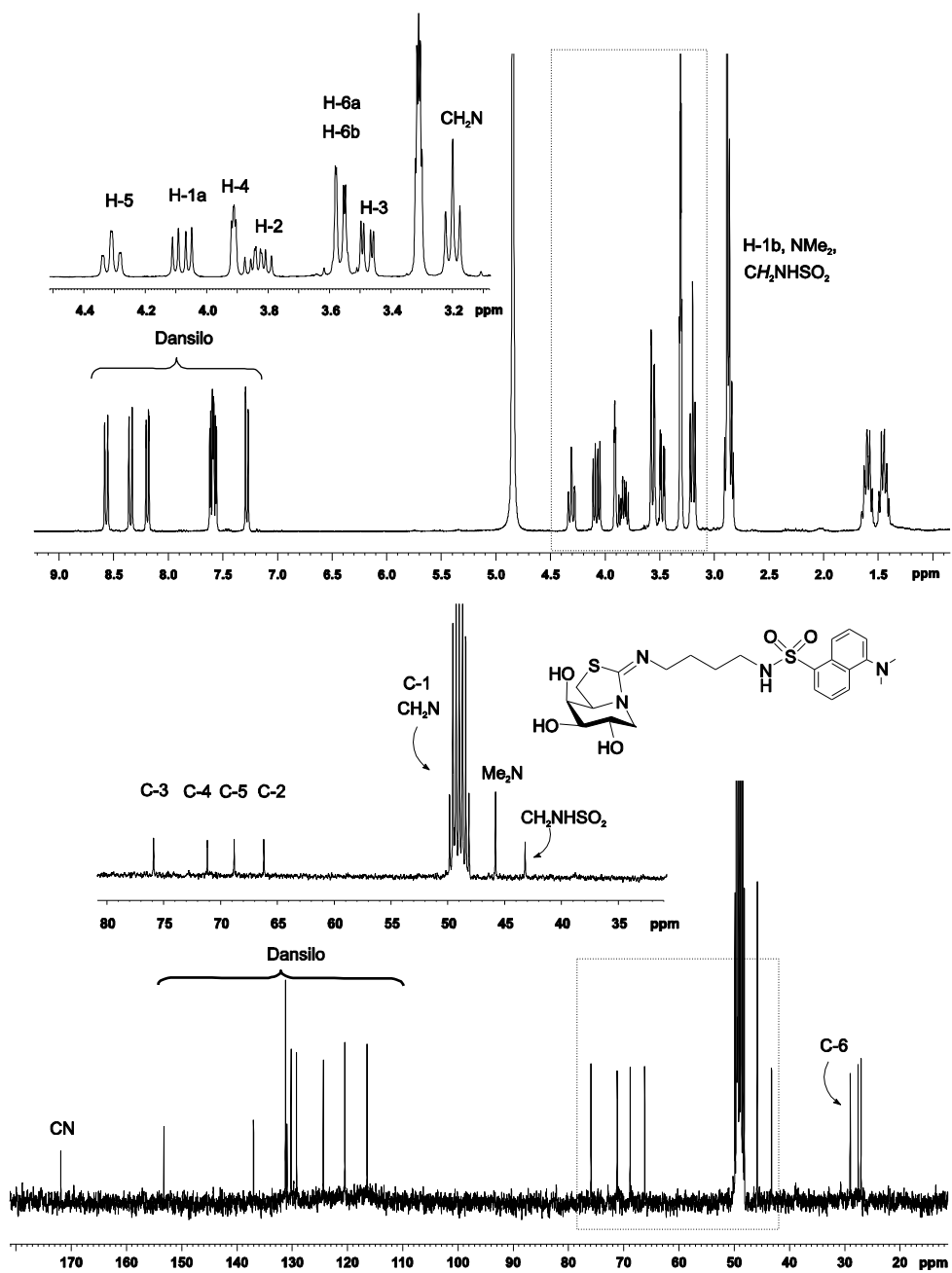


Figura 4.3. Espectros de ^1H y ^{13}C RMN (300 MHz, 75.5 MHz, CD_3OD) de 34.

La actividad como inhibidores de glicosidasas de ambas series de derivados de DGJ se evaluó frente a un panel de glicosidasas comerciales entre las que se encontraban la α -Galasa de grano de café, perteneciente a la misma familia (GH 27) que la α -Galasa lisosomal humana, y las β -Galasas de *E. coli* y de hígado de buey, ambas pertenecientes al mismo clan (GH A) que la β -Gal lisosomal humana.⁵ Los valores de las constantes de inhibición (K_i) se recogen en la Tabla 4.1. En la mayoría de los casos se observó un modo de inhibición competitivo (Figura 4.4) y una elevada selectividad enzimática frente a las galactosidasas, de acuerdo con su perfil de configuración D-galacto.

Tabla 4.1. Comparación de la actividad como inhibidores de glicosidasas (K_i , μ M) para los derivados monocíclicos de DGJ.^a

Enzimas	Sustituyentes alifáticos					Sustituyentes aromáticos				
	19	20	23	24	28	21	22	25	26	27
β-Glcasa										
Buey	144	33	40	5.2	n.d.	239	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Almendra	186	6.7	18	2.1	6.5	9.1	3.5	5.7	17	3.0
Naringinasa	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	203	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
α-Galasa										
Café	0.044	0.029	0.21	0.13	0.18	0.002	0.011	0.007	0.015	0.008
<i>Asp. Níger</i>	51	47	63	88	49	2.4	2.9	2.5	2.1	1.9
β-Galasa										
Buey	98	25	18	4.8	3.2	526	13	83	120	108
<i>E. Coli</i>	189	18	73	35	46	5.2	16	19	27	12

n. i. No se detectó inhibición. n.d. No determinado. ^aNinguno de los compuestos mostró inhibición frente a la enzima α -Glcasa (levadura), isomaltasa (levadura), amiloglicosidasa (*Aspergillus Níger*), trehalasa (riñón de cerdo), α -Manasa (judía Jack), β -Manasa (*Helix pomatia*).

Los derivados monocíclicos mostraron una alta potencia de inhibición y selectividad hacia la α -Galasa de grano verde de café, comportándose como inhibidores en el rango submicromolar bajo o nanomolar bajo. La potencia de inhibición es de 2 a 5 órdenes de magnitud inferior frente a β -Glc(Gal)asas. Los derivados con sustituyentes aromáticos presentaron una potencia de inhibición mayor, con valores de K_i comprendidos entre 2 y 15 nM, que los derivados con sustituyentes alifáticos (K_i entre 29 y 210 nM) (Tabla 4.1).

Tabla 4.2. Comparación de la actividad como inhibidores de glicosidasas (K_i , μ M) para los derivados bicíclicos de DGJ.^a

Enzimas	Sustituyentes alifáticos					Sustituyentes aromáticos				
	29	30	33	34	38	31	32	35	36	37
β-Glcasa										
Hígado de buey	5.2	0.57	97	0.84	n.d.	26	2.2	n.d.	n.d.	n.d.
Almendra pH 7.3	0.31	0.03	6.9	0.047	0.012	3.7	18	0.30	0.17	0.39
Almendra pH 5.5	n.d.	n.d.	3.9	0.27	0.11	n.d.	0.64	0.29	0.13	0.21
Naringinasa	164	27	548	15	49	208	n.i.	403	n.i.	n.i.
α-Galasa										
Grano de café	134	81	3.3	309	258	18	4.9	26	63	3.9
<i>Asp. Níger</i>	n.d.	n.d.	226	n.i.	n.d.	n.d.	331	n.d.	n.i.	n.i.
β-Galasa										
Hígado de buey	2.9	0.20	83	0.54	0.08	6.9	4.6	19	13	27
<i>Escherichia coli</i>	7.3	0.65	13	1.1	11	13	0.64	6.0	7.4	14

n. i. No se detectó inhibición. n.d. No determinado. ^aNinguno de los compuestos mostró inhibición frente a las enzimas α -Glcasa (levadura), isomaltasa (levadura), amiloglicosidasa (*Aspergillus Níger*), trehalasa (riñón de cerdo), α -Manasa (judía Jack), β -Manasa (*Helix pomatia*).

En el caso de los derivados bicíclicos, se observó un aumento notable de la potencia de inhibición frente a β -Galasas y una drástica disminución de la potencia de inhibición frente a α -Galasas. Estos derivados se comportaron como inhibidores potentes de β -Galasas de *E. Coli* (K_i 0.64 μ M para **32**) y de hígado de buey (K_i 0.08 μ M para **38**), con valores de K_i en el rango micromolar bajo o submicromolar (Figura 4.5). También se observó un aumento en la potencia de inhibición hacia β -Glucosas, destacando el derivado **34**, el cual se comportó como inhibidor nanomolar para β -Glucosas (K_i 47 nM frente a la β -Glucosa de almendra a pH 7.3). Es interesante destacar el aumento de K_i en un orden de magnitud al pasar a pH ácido (K_i 0.27 μ M a pH 5.5). Sin embargo, la potencia de inhibición de este derivado disminuyó cuatro órdenes de magnitud frente a la α -Galasa (K_i 309 μ M) y no presentó inhibición frente a la α -Galasa de *Aspergillus Níger* (Tabla 4.2).

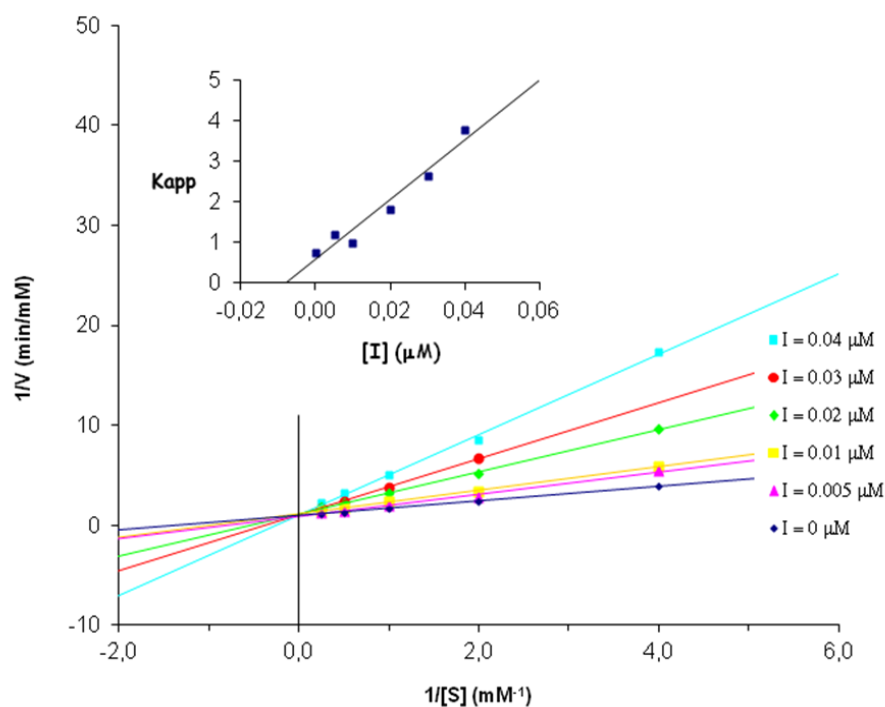


Figura 4.4. Representación de tipo Lineweaver-Burk para la determinación de K_i (0.008 μ M) de **27** frente a la α -Galasa (grano de café; pH 6.8).

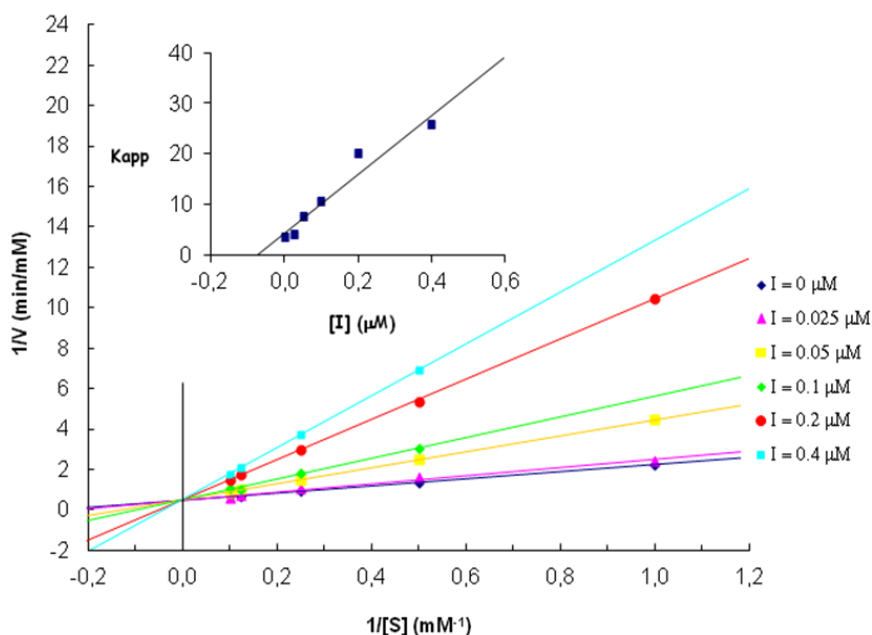


Figura 4.5. Representación de tipo Lineweaver-Burk para la determinación de K_i ($0.08 \mu\text{M}$) de **38** frente a la β -Galasa (hígado de buey; pH 7.3).

4.3. Determinación del valor de pK_a de los derivados de DGJ mediante valoración por ^1H RMN.

De acuerdo con los resultados comentados en el apartado anterior, los derivados monocíclicos y bicíclicos de la DGJ muestran un comportamiento inhibitorio completamente diferente frente a las α - y β -Galasa. Mientras que los derivados monocíclicos se comportan como inhibidores potentes frente a la α -Galasa, los análogos bicíclicos se comportan como inhibidores potentes y selectivos de las β -Galasas, observándose además una influencia de la naturaleza alifática o aromática del sustituyente. Con objeto de relacionar la basicidad de los iminoazúcares con su actividad, decidimos determinar los valores de pK_a de los derivados bicíclicos **29**, **31** y **36** mediante valoración ácido-base empleando la espectroscopía de ^1H RMN.

Las primeras determinaciones de pK_a empleando la espectroscopía de RMN se llevaron a cabo en los años setenta por M. W. Mosher y colaboradores.⁶ Estos autores fueron capaces de determinar el valor de pK_a de una serie de piridinas sustituidas mediante esta técnica espectroscópica. El método se basa en la dependencia del desplazamiento químico de las señales de los protones con el pH debido al diferente apantallamiento de estos núcleos en sus diferentes estados de ionización. En general, el desplazamiento químico de un núcleo próximo al grupo ionizable (δ_0) varía con el pH de acuerdo con la ecuación de Henderson-Hasselbalch,⁷ expresada en función de los desplazamientos químicos:

$$pH = pK_a + \log \frac{\delta_0 - \delta_{AH}}{\delta_A - \delta_0}$$

donde, δ_{AH} es el desplazamiento químico de la forma ácida, δ_A es el desplazamiento químico de la forma básica y pK_a se define como el $-\log K_a$, siendo K_a la constante de acidez del grupo ionizable (Figura 4.6). El procedimiento descrito resulta fácil de aplicar dada la sencillez en la determinación de los parámetros, extendiéndose rápidamente al campo de la biomedicina, permitiendo la medida de los valores de pH intra- y extracelular,⁸ lo que tiene una repercusión diagnóstica fundamental.⁹

Los valores de pK_a de los derivados bicíclicos **29**, **31** y **36** se determinaron mediante valoración por ^1H -RMN a 25 ± 0.1 °C a valores de pH comprendidos en el intervalo 1.85-11.52. Se emplearon disoluciones a una concentración 2 mM en una mezcla H_2O -DMSO- d_6 9:1, conteniendo HCl (10 mM) y NaCl (100 mM). Una vez registrado el espectro inicial, se adicionaron alícuotas de una disolución 10 mM de NaOH, que contenía el iminoazúcar (2 mM) correspondiente y NaCl (100 mM), de modo que la concentración del iminoazúcar se mantuvo constante durante el experimento. El volumen final fue de 1.2 mL y, tras el tratamiento matemático de las variaciones de δ , se determinaron los valores de pK_a que resultaron ser 5.32, 9.13 y 5.37 (Figuras 4.7-4.9), respectivamente, que indican una mayor acidez de los derivados con sustituyentes aromáticos.

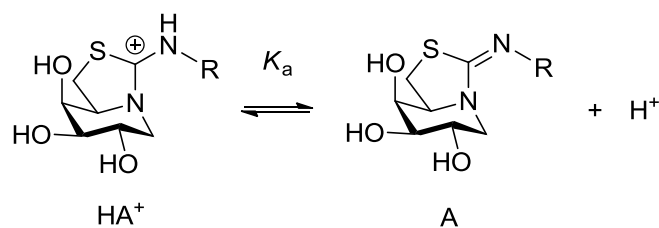


Figura 4.6. Equilibrio entre los derivados bicíclicos de DGJ y sus sales.

En el caso de los derivados monocíclicos, se abordó la determinación de los valores de pK_a mediante valoración por espectroscopía de 1H -RMN, en el intervalo de pH comprendido entre 1.9-12.0, y, además, mediante espectrofotometría UV-visible empleando el intervalo de longitud de onda comprendida entre 400-200 nm. Sin embargo, en el caso de estos derivados no se observó variación ni en el desplazamiento químico de las señales ni en la absorción máxima de los espectros UV debida al grupo tiourea, por lo que no fue posible la determinación del valor de pK_a .

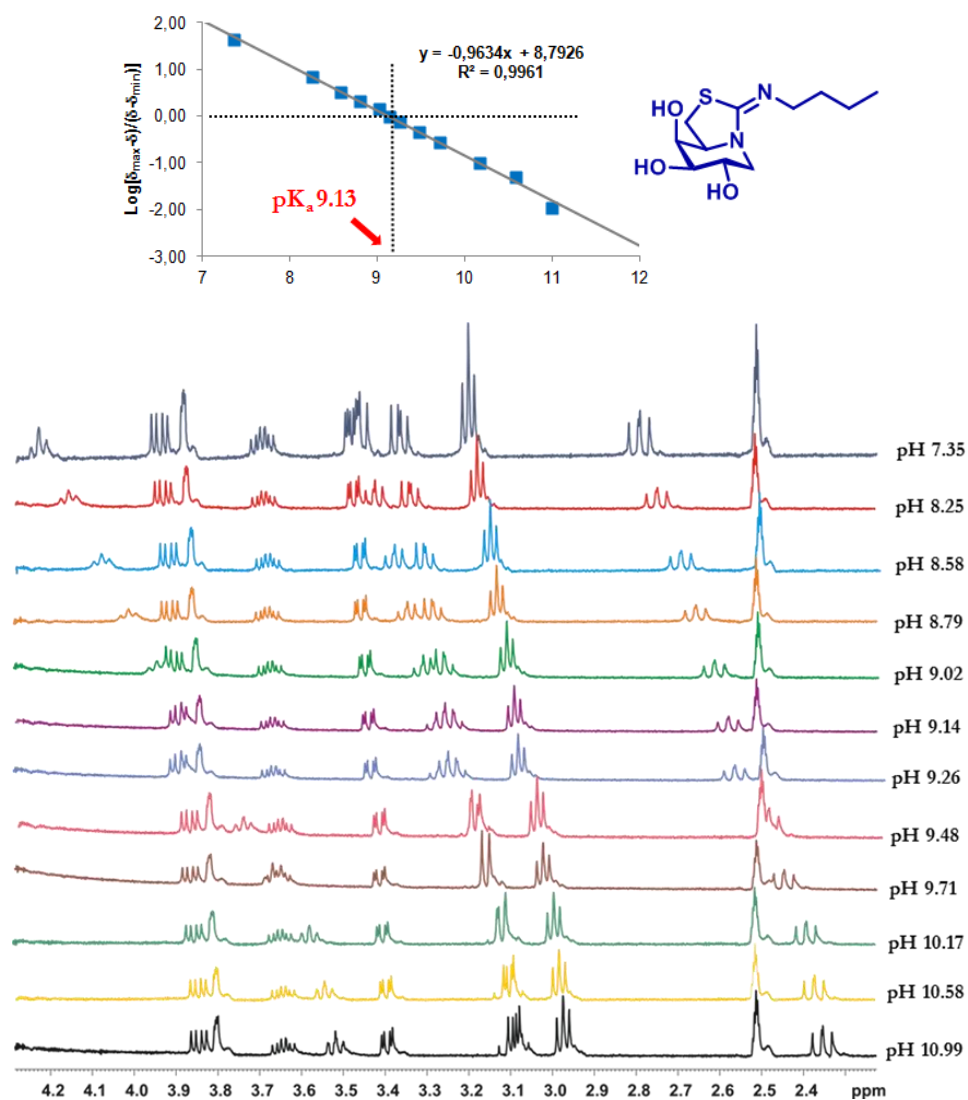


Figura 4.7. Determinación del valor de pK_a de **29** mediante ^1H RMN. Representación logarítmica de la relación de desplazamientos químicos de las señales del espectro que se desplazan con el pH. Superposición de los espectros de ^1H RMN a diferentes valores de pH.

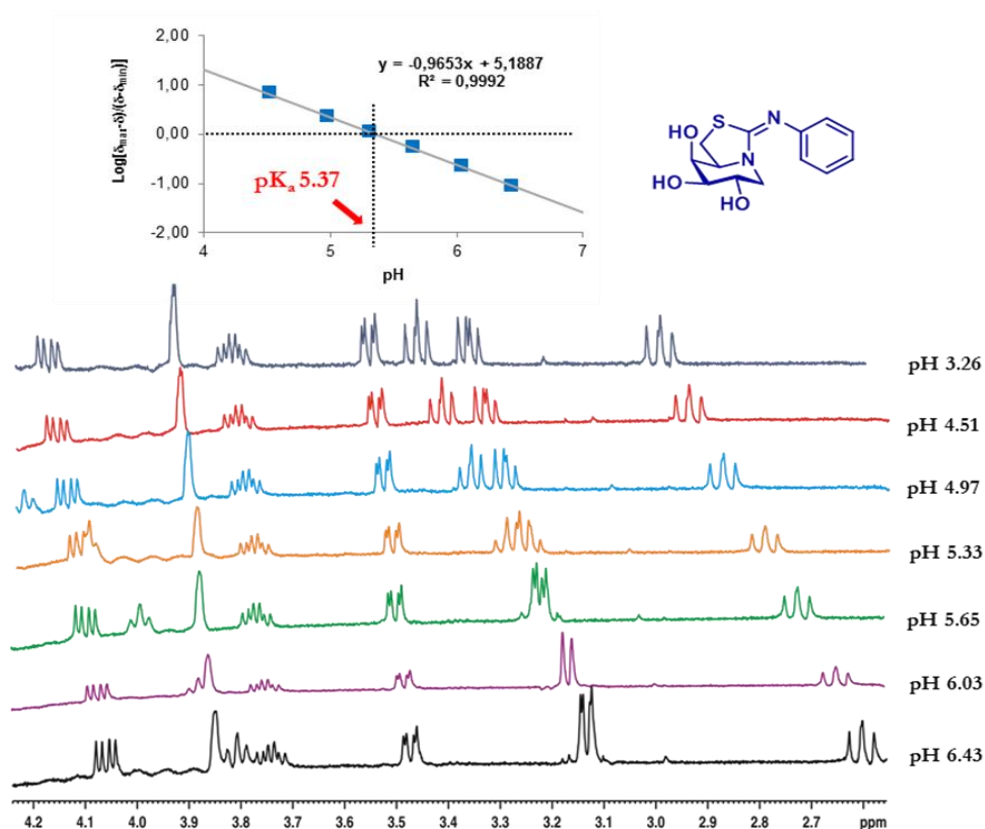


Figura 4.8. Determinación del valor de pK_a de **31** mediante ^1H RMN. Representación logarítmica de la relación de desplazamientos químicos de las señales del espectro que se desplazan con el pH. Superposición de los espectros de ^1H RMN a diferentes valores de pH.

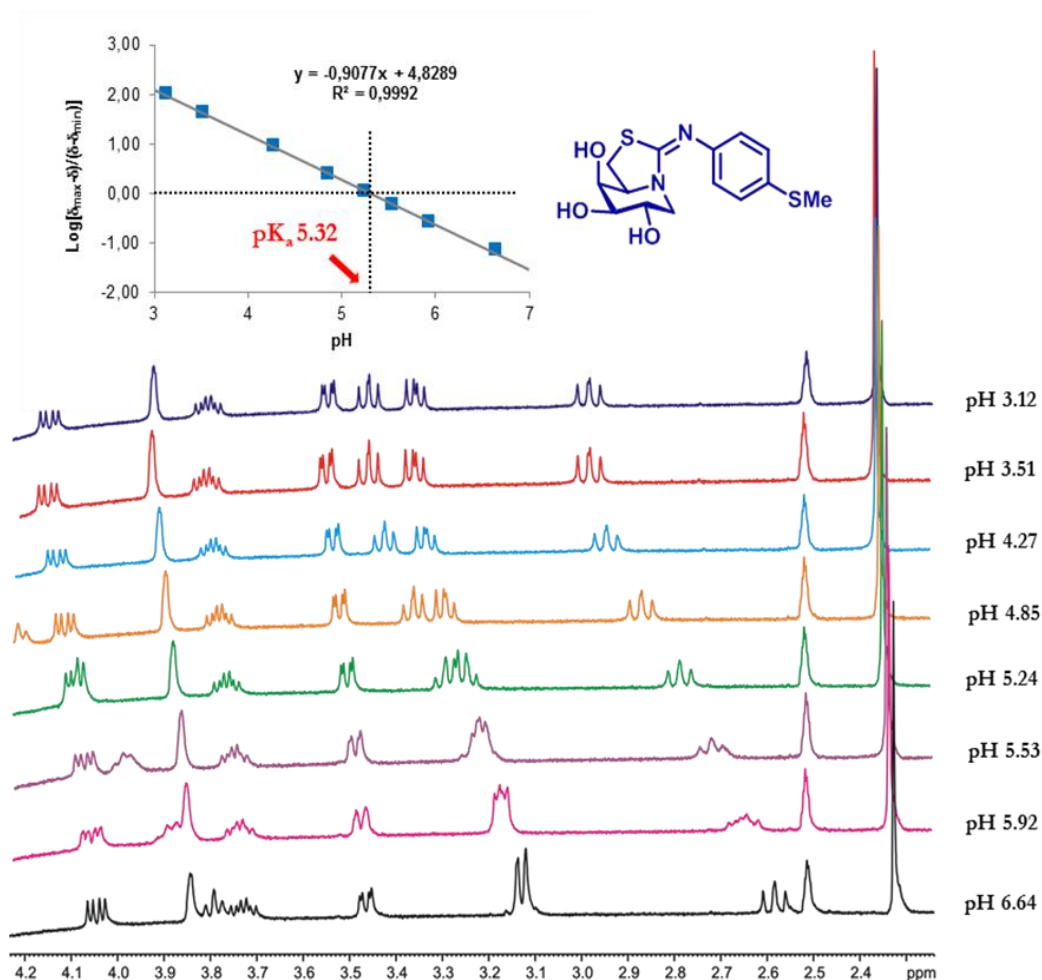


Figura 4.9. Determinación del valor de pK_a de **36** mediante ^1H RMN. Representación logarítmica de la relación de desplazamientos químicos de las señales del espectro que se desplazan con el pH. Superposición de los espectros de ^1H RMN a diferentes valores de pH.

4.4. Determinación del valor de K_d mediante valoración por transferencia de la energía de resonancia de fluorescencia (FRET).

La estrategia sintética desarrollada para la preparación de iminoazúcares sp^2 derivados de DGJ ha permitido la incorporación de sondas fluorescentes, que son herramientas muy valiosas para estudios de localización celular y para estudios de interacciones con las proteínas.¹⁰

La emisión de luz por un fluoróforo puede ser modulada por la presencia cercana de especies fluorescentes mediante el fenómeno conocido como transferencia de la energía de resonancia de fluorescencia (FRET, *Fluorescence Resonance Energy Transfer*). En estos procesos, la intensidad de fluorescencia de un fluoróforo disminuye significativamente cuando éste se encuentra en la proximidad de otro fluoróforo o “quencher”, por ejemplo los grupos triptófanos presentes en proteínas. Para que este fenómeno tenga lugar es imprescindible que el espectro de emisión del fluoróforo donador solape con el espectro de absorción del fluoróforo aceptor (Figura 4.10).

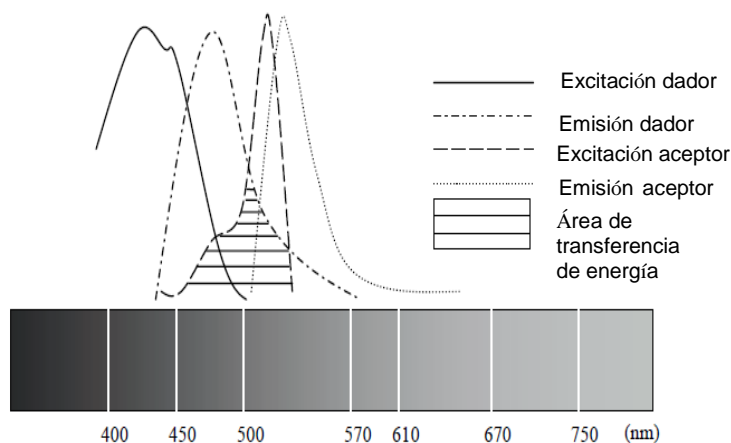


Figura 4.10. Representación de los espectros de excitación y emisión de un par de fluoróforos entre los que se produce transferencia de energía.

Este fenómeno es una interacción fuertemente dependiente de la proximidad de los dos grupos, de tal modo que su eficacia varía inversamente con la sexta potencia de la distancia entre ambas especies, por ello la transferencia de energía sólo se produce si el inhibidor está asociado a la enzima. Debido a ello, esta técnica es una herramienta de trabajo muy útil para el estudio de sistemas de pequeñas dimensiones, como por ejemplo el estudio de las interacciones enzima-inhibidor. A la vista de estos antecedentes, nos propusimos estudiar la interacción entre el iminoazúcar **34**, que incorpora el grupo dansilo, y la β -Glucasa de almendra. El fluoróforo dansilo ($\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 511 \text{ nm}$) presente en el iminoazúcar disminuye muy eficazmente la emisión de fluorescencia del grupo triptófano ($\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 340 \text{ nm}$) a través de un proceso de transferencia de energía (Figura 4.11). El derivado **34** se comportó como inhibidor potente de β -Glucasa de almendra ($K_i = 0.047 \text{ } \mu\text{M}$), lo que ha permitido que mediante el empleo de la técnica FRET se haya determinado la estequiometría del complejo **34**- β Glucasa así como el valor de la constante de disociación (K_d) del mismo en tiempo real.



Figura 4.11. Representación del fenómeno FRET entre el triptófano y la sonda fluorescente dansilo.

Los experimentos de valoración se llevaron a cabo a $37 \pm 0.1 \text{ } ^\circ\text{C}$ utilizando un rango de longitudes de onda de emisión entre 300 nm y 550 nm. En un experimento típico de valoración, se preparó una disolución de β -Glucasa de almendra $1.53 \text{ } \mu\text{M}$ en tampón fosfato 50 mM (pH 7.3) y se registró el espectro inicial tras excitación del grupo triptófano a la energía del máximo de absorción ($\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$). La adición de alícuotas

de una disolución 20 μM de **34** originó una disminución del valor de la fluorescencia del triptófano a 340 nm (λ_{em} triptófano = λ_{exc} dansilo) y un incremento del valor a 511 nm (λ_{em} dansilo) (Figura 4.12).

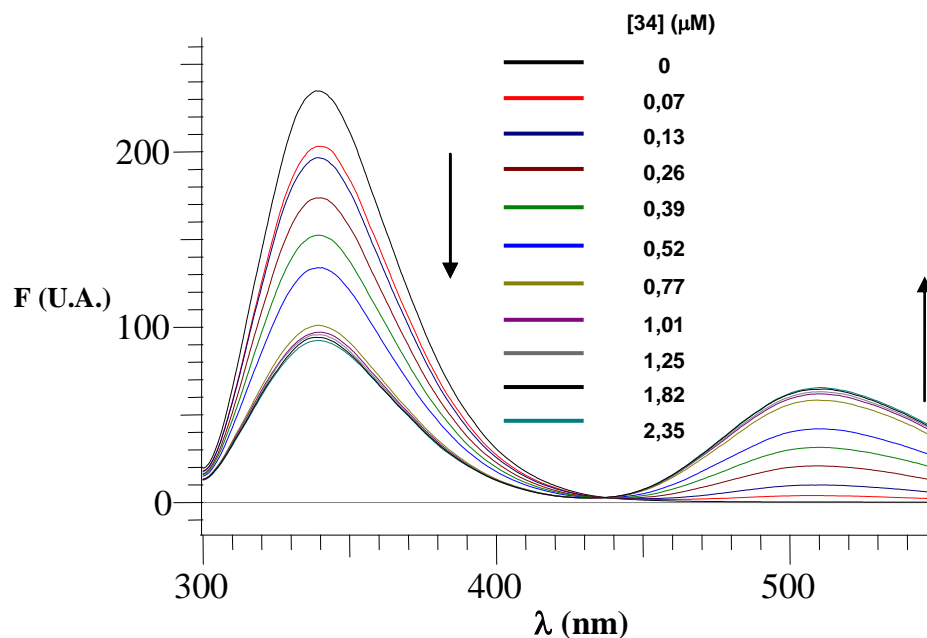


Figura 4.12. Extinción (“quenching”) de la fluorescencia del triptófano de la β -Glcasa de almendra por adición de cantidades variables del iminoazúcar **34**.

La determinación de la estequiometría del complejo **34**- β Glcasa empleando esta técnica se llevó a cabo representando la diferencia de valores de fluorescencia ($F - F_0$) en función de la razón molar $[\mathbf{34}]/[\beta\text{-Glcasa}]$ e indicó una estequiometría 1:1, basada en el cociente inhibidor/enzima en el punto de inflexión de la curva de valoración (Figura 4.13). Finalmente, la isoterma de complejación obtenida en los experimentos de valoración, añadiendo cantidades crecientes del inhibidor a la enzima, permitieron determinar un valor de la constante de disociación (K_d) de 16 nM (Figura 4.14), acorde con el valor obtenido cinéticamente ($K_i = 47$ nM).

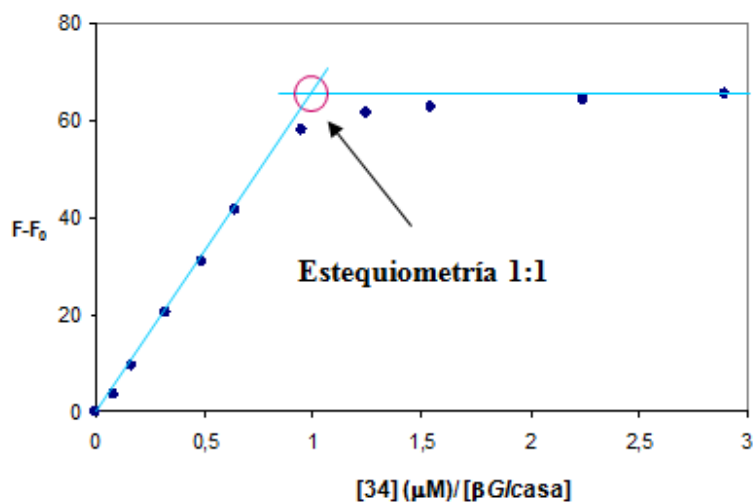


Figura 4.13. Determinación de la estequiometría del complejo **34**-βGlucosa de almendra ($\lambda_{\text{exc}} = 340 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 511 \text{ nm}$).

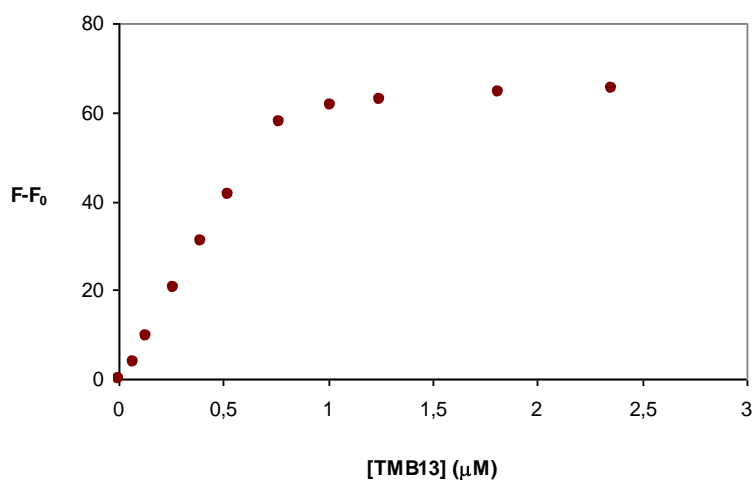


Figura 4.14. Isotherma de asociación para el complejo **34**-βGlucosa de almendra.

4.5. Evaluación de los derivados de DGJ frente a glicosidasas lisosomales humanas.

4.5.1. Estudios de la actividad como inhibidores de glicosidasas lisosomales humanas y de estabilidad térmica de los derivados monocíclicos de DGJ.

El estudio del perfil de inhibición de los derivados monocíclicos de DGJ frente a enzimas comerciales puso de manifiesto que se comportan como inhibidores selectivos y potentes, en el rango nanomolar, de α -Galasas. El siguiente objetivo consistió en la evaluación de la actividad chaperona *in vitro* e *in vivo* frente a diversas mutaciones de α -Gal asociadas a FD. Esta evaluación se ha llevado a cabo en colaboración con los grupos del Prof. Y. Suzuki (Internacional University of Health and Welfare, Otawara) y del Prof. K. Higaki (Tottori University, Tokio).

En primer lugar, se determinó el perfil de selectividad frente a diferentes glicosidasas lisosomales empleando lisados de fibroblastos humanos normales (Tabla 4.3). Los resultados obtenidos muestran que los derivados monocíclicos de DGJ se comportan como excelentes inhibidores de α -Gal A, con una potencia comparable a la de la DGJ en el caso de los derivados con sustituyentes aromáticos, mostrando además una mayor especificidad que la DGJ ya que no inhibieron o mostraron inhibición muy débil frente a otras enzimas lisosomales como β -Gal, α -Glc, β -Glc y *N*-acetil- β -glucosaminidasa. Es interesante destacar que la potencia de inhibición frente a la α -Gal A disminuyó un orden de magnitud al pasar de pH neutro a pH ácido en el caso de los derivados **20** y **21**, lo que indica una mayor afinidad de estos derivados por las enzimas en el RE (pH 7.3) que en el lisosoma (pH 5.0), lo que hace que sean buenos candidatos para su estudio como PCs para el tratamiento de FD (Figura 4.15).³

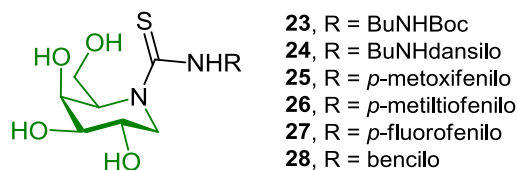


Figura 4.15. Estructura de los derivados monocíclicos incluidos en el estudio de estabilidad térmica de la α -Gal A.

Tabla 4.3. Comparación de la actividad como inhibidores de glicosidasas comerciales (K_i , μM) y enzimas lisosomales humanas (IC_{50} , μM) de los derivados monocíclicos de DGJ en comparación con la DGJ.^a

	Enzimas lisosomales humanas (pH 5.0/7.0, IC_{50} μM)			Enzimas comerciales (K_i μM)	
	α -Gal <i>H. s.</i>	β -Gal <i>H. s.</i>	β -GlcNAc <i>H. s.</i>	α -Galasa (café)	β -Galasa (<i>E. Coli</i>)
DGJ¹¹	0.03/0.01	25/n.d.	n.i.	0.016	12
20	37/5.0	n.i.	n.i.	0.029	18
21	4.5/0.2	n.i.	n.i.	0.002	5.2
22	1.1/n.d.	3300	52	0.011	16
23	32/n.d.	n.d.	n.d.	0.21	73
24	19/n.d.	n.d.	n.d.	0.13	35
25	0.08/n.d.	47700	49	0.007	19
26	0.04/n.d.	2100	144	0.015	27
27	0.4/n.d.	81300	126	0.008	12
28	5.8/n.d.	n.i.	1990	0.18	46

n. i. No se detectó inhibición. n.d. No determinado. ^aNinguno de los compuestos mostró inhibición frente a las enzimas lisosomales humanas α -Glcasa y β -Glcasa.

En una primera aproximación, la capacidad de un iminoazúcar para estabilizar la enzima lisosomal frente a la desnaturalización térmica puede usarse como una indicación del potencial del iminoazúcar como PC.¹² Con este fin, se evaluó la cinética de desnaturalización de la α -Gal A a 48 °C en presencia de diferentes concentraciones de los

derivados monocíclicos **20**, **21** y **23-28** (0.3, 3 y 30 μ M). Los ensayos se llevaron a cabo en lisados de fibroblastos humanos sanos y mutantes R301G, una de las mutaciones más frecuentes entre los pacientes de FD. En ausencia de chaperona, la actividad enzimática en fibroblastos sanos se redujo al 15% después de 20 minutos y prácticamente fue inexistente después de 40 minutos de incubación (Figura 4.16). En cambio, en presencia del iminoazúcar a una concentración 3 o 30 μ M, la enzima conservó el 50-80% de su actividad después de 60 minutos a 48 °C (Figuras 4.16 y 4.17). Los derivados **20**, **21**, **23** y **24** también mostraron un efecto positivo en la protección de α -Gal A frente a la desnaturalización en el caso de los fibroblastos afectados por la mutación R301G. En su presencia, a una concentración de 30 μ M, se conservó el 85% de la actividad enzimática después de 20 minutos a 48 °C y el 50-80% de la actividad tras 60 minutos de incubación.

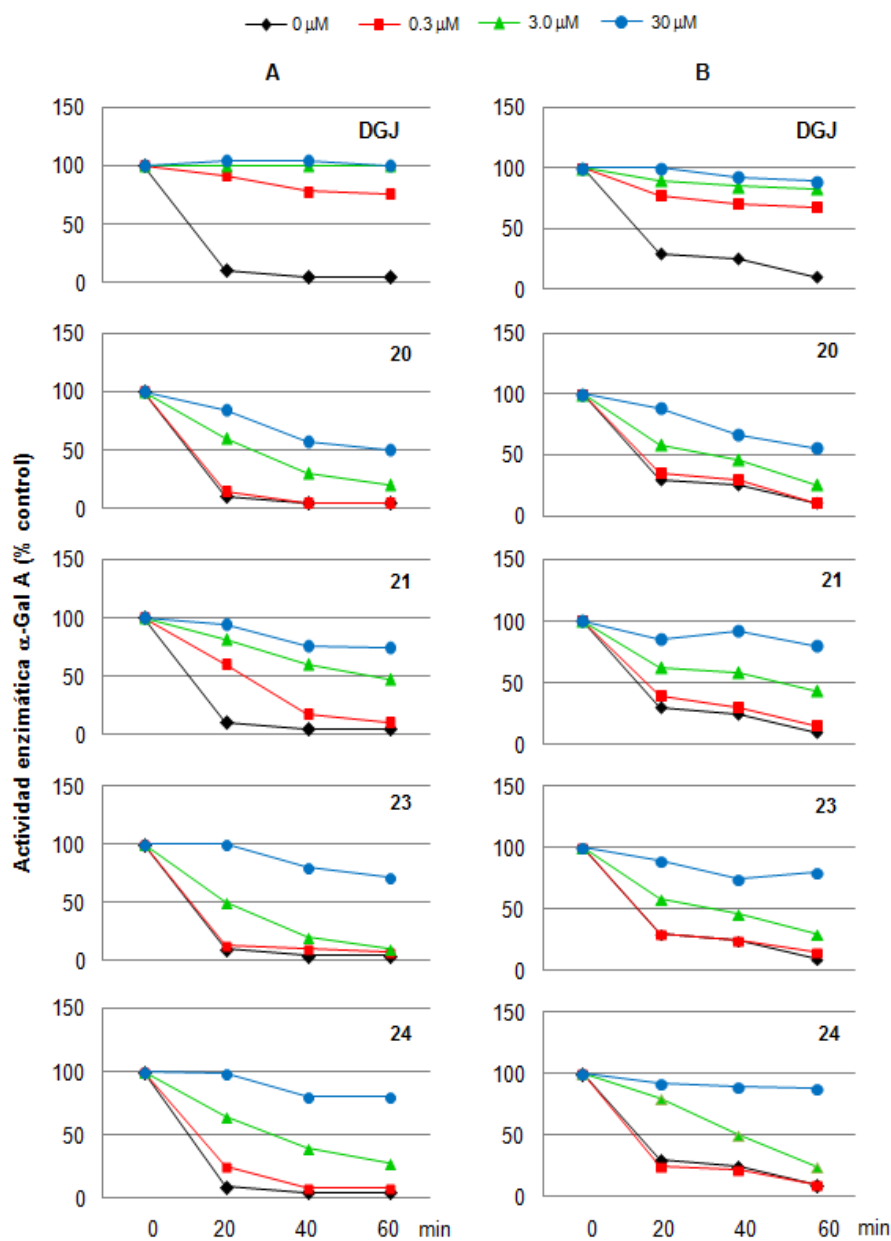


Figura 4.16. Efecto de los derivados **20**, **21**, **23** y **24** en la protección de α -Gal A frente a la degradación térmica inducida *in vitro* en lisados de fibroblastos humanos sanos (A) o en lisados de fibroblastos derivados de la mutación homocigótica R301G (B) a 48 °C y pH 7.0. Los valores son relativos a la actividad enzimática en ausencia de chaperona (100%).

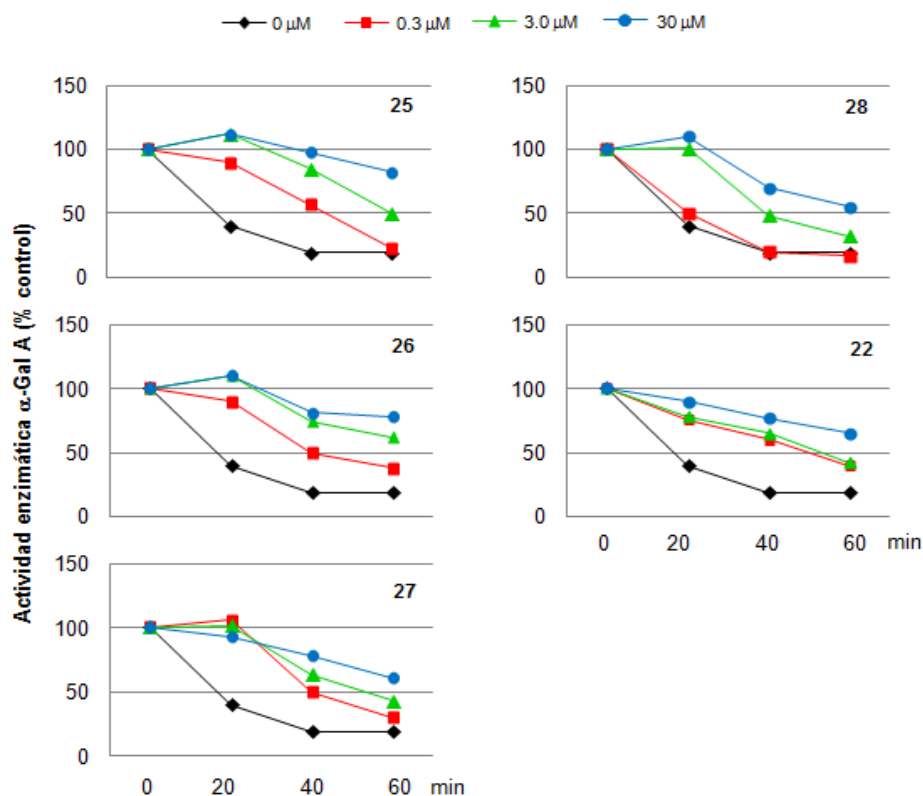


Figura 4.17. Efecto de los derivados **22**, **25-28** en la protección de α -Gal A en la degradación térmica inducida *in vitro* en lisados de fibroblastos humanos sanos a 48 °C y pH 7.0. Los valores son relativos a la actividad enzimática en ausencia de chaperona como 100%.

4.5.2. Evaluación de la actividad como chaperonas farmacológicas de los derivados monocíclicos de DGJ en fibroblastos de pacientes de FD y en células COS.

Con objeto de evaluar la capacidad como posibles PCs para FD de los derivados monocíclicos de DGJ, se ha llevado a cabo en primer lugar un estudio del aumento de la actividad enzimática residual para los derivados **20**, **21**, **23** y **24** (Figura 4.18) en función del tiempo, utilizando fibroblastos normales (*Wild type*, WT) y fibroblastos de pacientes de FD afectados por la mutación R301G. Estos ensayos se realizaron incubando las

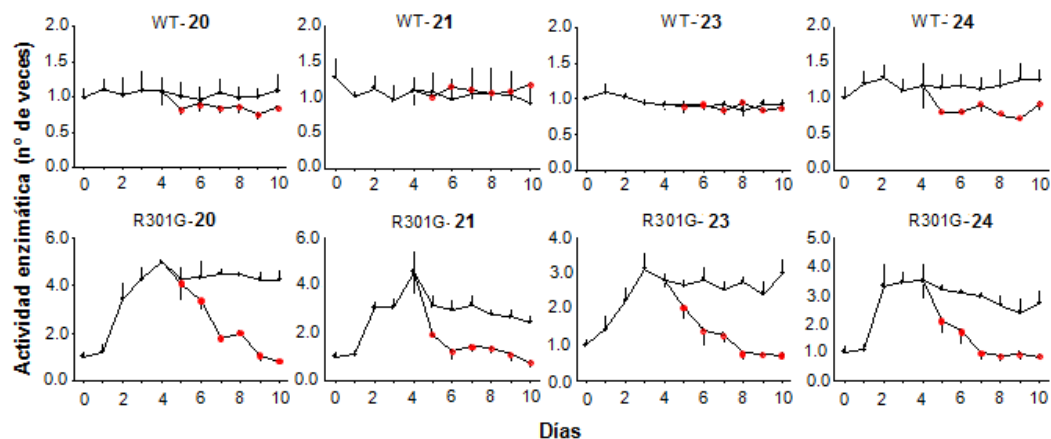


Figura 4.19. Actividad de los derivados **20**, **21**, **23** y **24** como PCs en fibroblastos humanos sanos y mutantes R301G de pacientes de FD en función del tiempo (•). Un conjunto de células se cultivaron durante cuatro días, se lavaron y se volvieron a cultivar en ausencia de chaperona durante seis días más (•).

A continuación, se llevó a cabo un estudio del aumento de actividad de la α -Gal A en fibroblastos en presencia de los derivados **20**, **21**, **23** y **24**, en comparación con la DGJ, a concentraciones crecientes de iminozúcar (0-30 μ M). Los resultados mostraron que en fibroblastos de individuos sanos los derivados monocíclicos incrementan ligeramente la actividad de la enzima en el rango de concentraciones 3-30 μ M y no la afectan a concentraciones menores (0.3-1 μ M). En el caso de fibroblastos de pacientes con la mutación R301G, el comportamiento como chaperonas de dichos derivados fue evidente. Tras 96 horas de incubación de las células en presencia de los iminoazúcares, la actividad enzimática aumentó un 300-350% y un 400-500% a concentraciones 3 μ M y 30 μ M de los derivados monocíclicos, respectivamente (Figura 4.20).

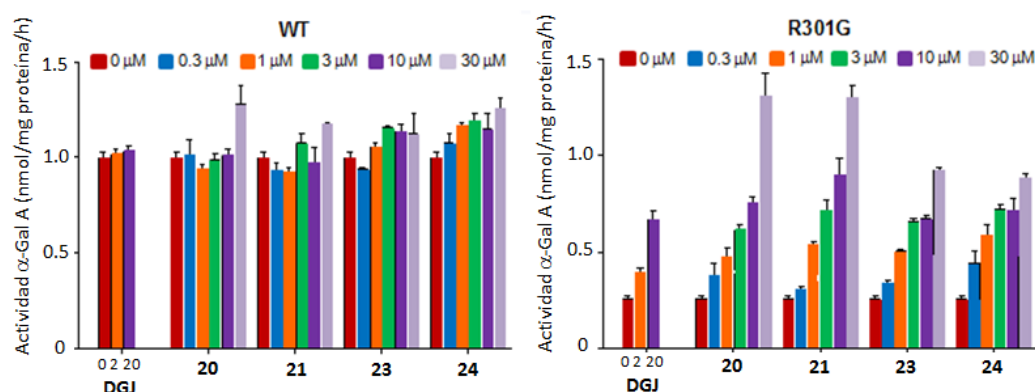


Figura 4.20. Actividad como PCs de los derivados **20**, **21**, **23** y **24** en comparación con DGJ en fibroblastos humanos sanos y mutantes (R301G) de FD. Cada barra representa la media de tres determinaciones.

La actividad como chaperona de los derivados aromáticos **22** y **25-28** se evaluó también en fibroblastos procedentes de pacientes de Fabry afectados por la mutación homocigótica Q279E, en comparación con la DGJ. Los resultados mostraron incrementos de la actividad enzimática de α -Gal A comparables con los obtenidos para el iminoazúcar de referencia DGJ incluso a concentraciones menores. Destacar que los derivados **22**, **25** y **26** mostraron efecto chaperona incluso a la menor concentración ensayada, 0.3 μ M (Figura 4.21).

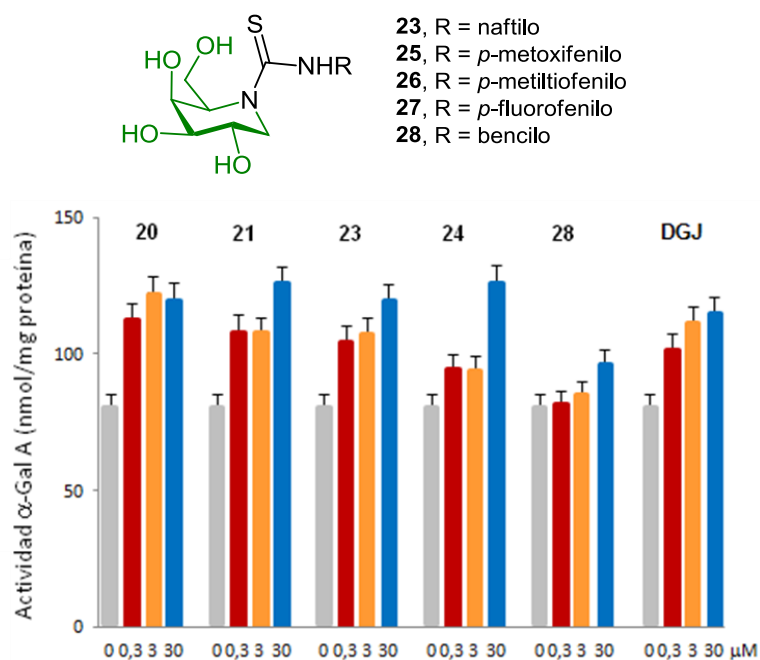


Figura 4.21. Estructura de los derivados monocíclicos aromáticos **22** y **25-28** y de su actividad como PCs en comparación con DGJ en fibroblastos mutantes (Q279E) de FD. Cada barra representa la media de tres determinaciones. *Indica incrementos de actividad enzimática estadísticamente significativos ($P < 0.001$).

Posteriormente, y para determinar el perfil de actividad en un rango amplio de mutaciones, se evaluó la actividad chaperona de los derivados **20**, **21**, **23** y **24** en células COS transfectadas con un total de 17 mutaciones homocigóticas, entre las que se encuentran A20P, E59K, E66Q, M72V, I91T, A97V, R112H, F113L, A156V, L166V, N215S, Q279E, M296I, M296V, R301Q, R356W y G373D. Los resultados mostraron que todos los derivados aumentaron la actividad enzimática residual de las enzimas mutantes, llegando incluso a superar la actividad observada en células normales en el caso de las mutaciones M296I y R301Q (Figura 4.22).

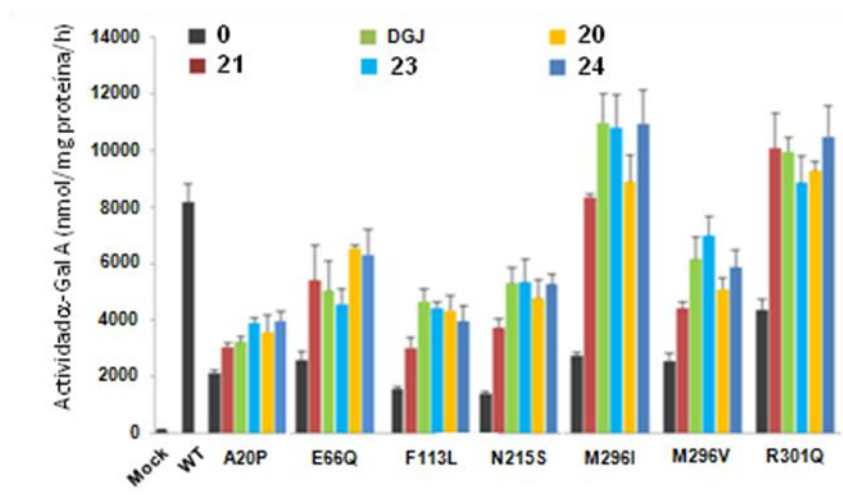


Figura 4.22. Efecto chaperona de los derivados **20**, **21**, **23** y **24** (30 μ M) en comparación con DGJ (20 μ M) sobre la α -Gal A expresada en células COS. Cada barra representa la media de tres determinaciones.

En el caso de los derivados aromáticos **22** y **25-27**, se llevó a cabo un estudio análogo empleando células COS transfectadas con las mutaciones homocigóticas A20P, E59K, E66Q, M72V, I91T, A97V, R112H, F113L, A156V, L166V, N215S, Q279E, M296I, M296V, R301Q y R356W, empleando concentraciones crecientes de iminoazúcar (0.3-30 μ M) y los resultados se compararon con los obtenidos para DGJ (20 μ M) (Figura 4.23). Todos los derivados mostraron efecto chaperona frente a todas las mutaciones ensayadas, excepto para la mutación A97V. El efecto chaperona fue igual o mayor al observado con la DGJ, incluso a concentraciones menores, en el caso de las mutaciones E66Q (Figura 4.23), A20P (Figura 4.24), M72V y M296V.

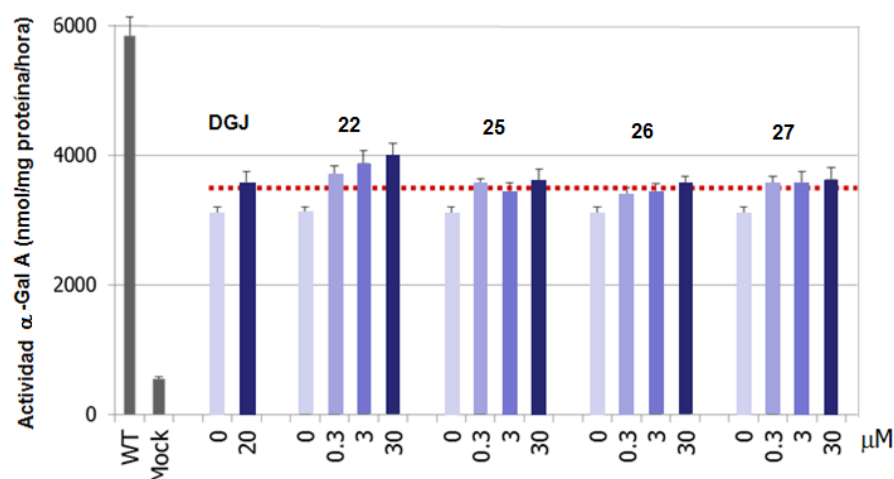


Figura 4.23. Efecto chaperona de los derivados **21** y **25-27** en comparación con DGJ sobre la α -Gal A en células COS transfectadas que expresan la mutación E66Q.

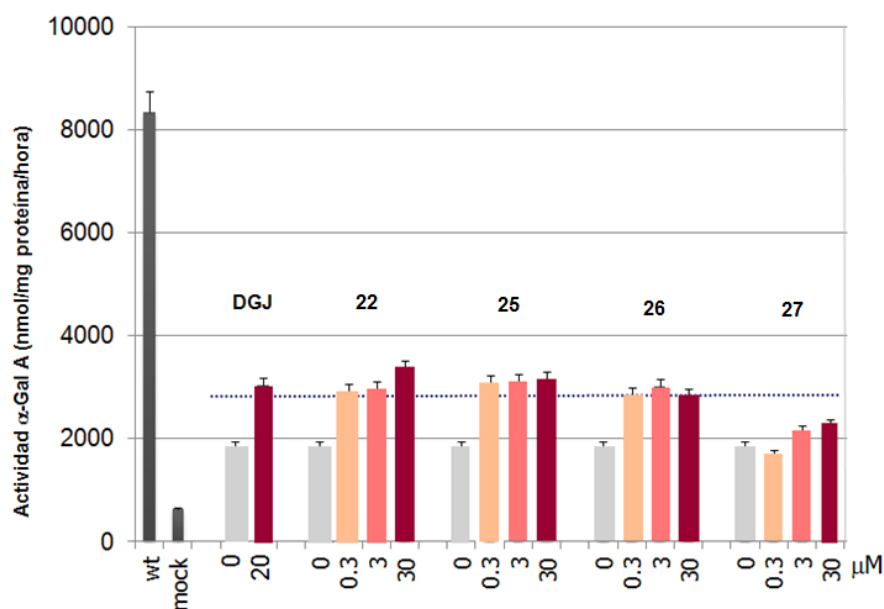


Figura 4.24. Efecto chaperona de los derivados **21** y **25-27** en comparación con la DGJ empleando células COS transfectadas con la mutación A20P. Las células transfectadas con α -Gal A mutantes se trataron con concentraciones crecientes de iminoazúcares o con DGJ.

El estudio de la actividad de la α -Gal A en fibroblastos humanos normales en presencia de los derivados **20** y **25-28** y de la DGJ, durante 96 horas, mostró que, mientras que la presencia de una disolución 20 μ M de DGJ reduce la actividad enzimática en un 20%, los derivados monocíclicos de DGJ aumentan dicha actividad en el rango de concentraciones estudiado. En este sentido, cabe destacar los derivados aromáticos **20** y **25**, para los que se observó un aumento del 50% de la actividad enzimática a concentraciones 3 μ M y 30 μ M, respectivamente (Figura 4.25).

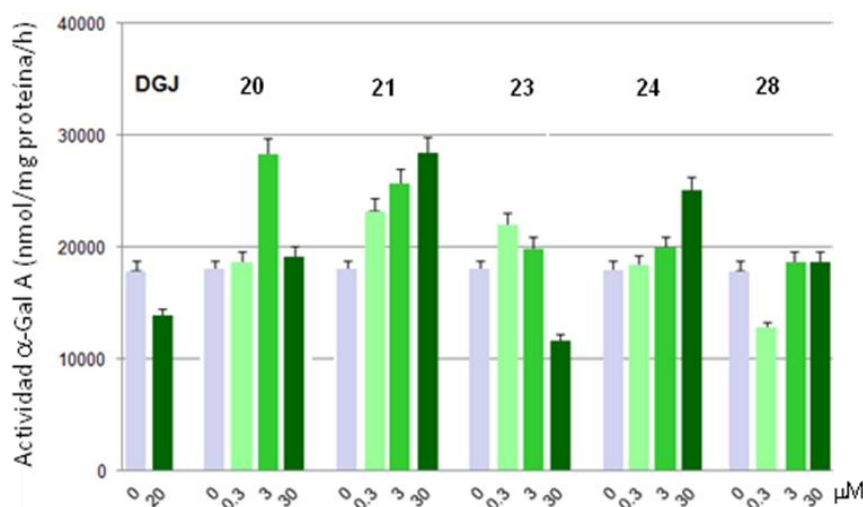


Figura 4.25. Efecto chaperona de los derivados **20** y **25-28** en comparación con DGJ sobre la α -Gal A en fibroblastos humanos normales. Cada barra representa la media de tres determinaciones.

Por último, se llevó a cabo un análisis de citotoxicidad celular de los derivados monocíclicos aromáticos en fibroblastos humanos normales. Para ello, se midió la actividad de la enzima citosólica *lactato deshidrogenasa* (LDH), que resulta liberada al medio extracelular después de graves alteraciones en la membrana plasmática. Los resultados mostraron una menor toxicidad de los derivados monocíclicos incluso a concentraciones superiores respecto a DGJ, salvo el derivado **26** que mostró una

toxicidad elevada a concentración 30 μM (Figura 4.26). Los derivados **20** y **31** no mostraron citotoxicidad a concentraciones inferiores a 500 μM .

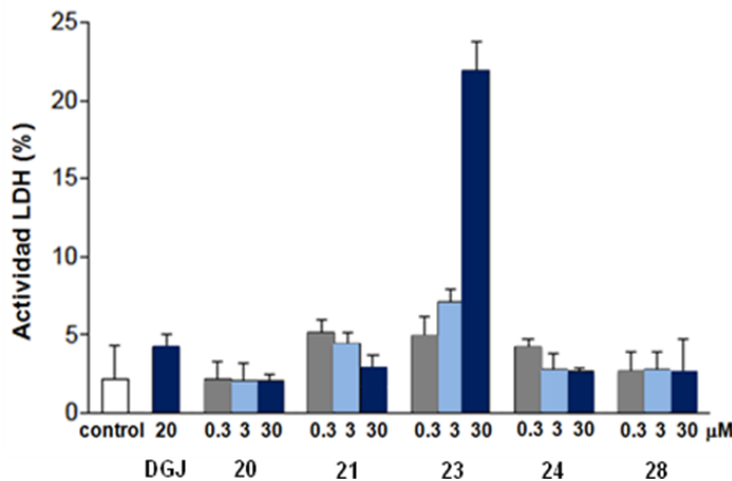


Figura 4.26. Estudio de citotoxicidad en fibroblastos humanos sanos para los derivados **22** y **25-28** en comparación con DGJ. Cada barra representa la media de tres determinaciones.

4.5.3. Efecto de los derivados monocíclicos de DGJ en los niveles de autofagia inducida en cultivos de fibroblastos humanos mutantes de Fabry.

La alteración en el mecanismo de autofagia es una característica común de las LSDs que parece jugar un papel fundamental en la patogénesis de estas enfermedades. Recientemente, se han publicado múltiples defectos en la autofagia atribuidos a las LSDs, entre los que se encuentra un incremento en los niveles de formación de autofagosomas debido a la disminución en el flujo autofágico (Figura 4.27).¹³ Consecuentemente, se produce un incremento en la expresión de las proteínas asociadas a los autofagosomas, como por ejemplo los marcadores LC3-II y p62, en líneas celulares con insuficiente actividad de glicosidasas.

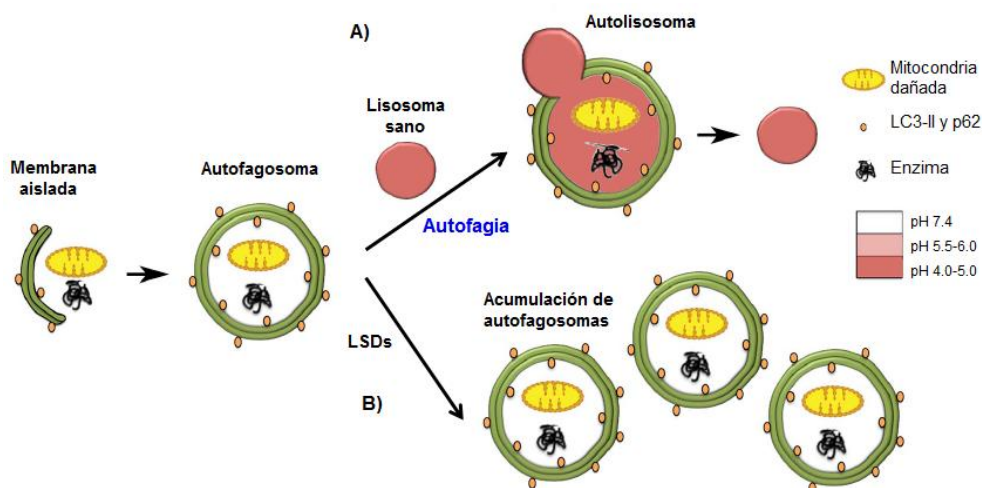


Figura 4.27. Mecanismo para la degradación del material celular dañado. A) La autofagia se inicia con la formación de una membrana aislada que secuestra el material dañado del citosol y lo encapsula en vesículas conocidas como autofagosomas. La fusión de los autofagosomas con los lisosomas para formar los autolisosomas y degradar el material dañado se conoce como flujo autofágico. B) En líneas celulares afectadas por LSDs, el lisosoma es incapaz de fusionarse con los autofagosomas, por lo que se produce un aumento de los niveles de autofagosomas y de los marcadores asociados a los mismos (LC3-II y p62).

Para examinar el efecto producido por los derivados de DGJ monocíclicos en el proceso de autofagia, se ha llevado a cabo un estudio sobre los niveles de expresión de dichos marcadores en líneas celulares procedentes de pacientes de Fabry en ausencia y en presencia de los iminoazúcares monocíclicos **25** y **27**. Los resultados mostraron niveles elevados en la expresión de los marcadores LC3-II y p62 en la línea celular deficiente en la enzima α -Gal A (control; mutación Q279E). Dichos niveles se redujeron significativamente en presencia de los derivados **25** y **27**, lo cual es indicativo de una disminución de la acumulación de autofagosomas y de un aumento en la regulación de la autofagia (Figura 4.28).

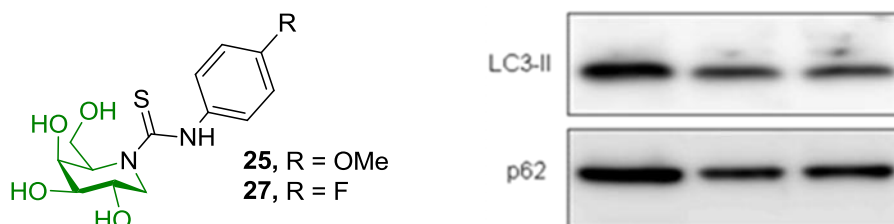


Figura 4.28. Efecto de **25** y **27** en los niveles de expresión de proteínas asociadas a los autofagosomas en cultivos celulares de fibroblastos humanos de Fabry Q279E.

4.5.4. Chaperonas farmacológicas y reguladores de la proteostasis en la corrección del plegamiento de las glicosidasas.

La proteostasis es el mecanismo que regula el equilibrio entre la síntesis, plegamiento, tráfico, agregación y degradación de proteínas.¹⁴ De este modo, la actividad enzimática de las glicosidasas mutantes se puede incrementar por co-administración de una PC más un regulador de la proteostasis. La combinación de ambas aproximaciones terapéuticas debe generar un efecto sinérgico, provocando un aumento de la actividad enzimática mayor que el producido por una PC y por un regulador de la proteostasis por separado. La principal ventaja que presenta la combinación entre la terapia de chaperona farmacológica y la terapia de regulador de la proteostasis (PRT, *Proteostasis Regulation Therapy*) frente a otras terapias combinadas (como por ejemplo, PCT + SRT o PCT + ERT) es la independencia de los reguladores de la proteostasis de las enzimas mutantes, lo cual resulta bastante ventajoso frente a un amplio número de desórdenes.

Para obtener una prueba de este concepto, se ha llevado a cabo un experimento para evaluar el incremento de la actividad enzimática de α -Gal A en presencia del derivado **25** y comparando dicho incremento con el obtenido tras combinarlo con una chaperona molecular (4-PBA, ácido 4-fenilbutírico) o con un regulador de la proteostasis (celastrol) en fibroblastos humanos mutantes Q279E (Figura 4.29). Los resultados

mostraron que la presencia del iminoazúcar **25** a 30 μM generó un aumento del 200% de la actividad enzimática de $\alpha\text{-Gal A}$. La combinación de **25** con 4-PBA o con celastrol a bajas concentraciones (0.1 mM y 0.1 μM , respectivamente) no generó un aumento adicional de la actividad enzimática. Por el contrario, la incubación de las células con **25** a 30 μM junto a 4-PBA o celastrol a mayor concentración (1 mM y 1 μM , respectivamente) implicó un incremento de la actividad enzimática del 10% o del 20%, respectivamente, en comparación con el producido únicamente por la presencia del derivado **25** (Figura 4.30). Este estudio sugiere que los reguladores de la proteostasis representan una alternativa adicional en la corrección del plegamiento de las glicosidasas lisosomales.

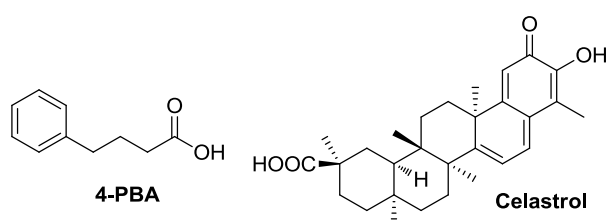


Figura 4.29. Estructuras químicas de 4-PBA y celastrol.

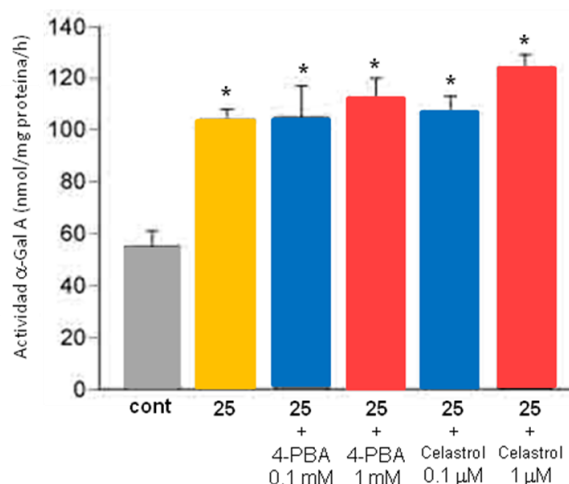


Figura 4.30. Efecto producido por combinación de PCT (25) con la presencia de una chaperona molecular o un regulador de la proteostasis en cultivos celulares de fibroblastos humanos mutantes Q279E.

4.6. Derivados bicíclicos de DGJ: evaluación de su potencial como chaperonas farmacológicas para el tratamiento de la gangliosidosis GM₁.

En el apartado 4.2 se mostraba la preparación de derivados bicíclicos de DGJ y su evaluación como inhibidores de glicosidasas. Dado su comportamiento como inhibidores potentes y específicos de β -Galasas comerciales, se han seleccionado algunos candidatos para su evaluación como chaperonas farmacológicas *in vitro* e *in vivo* frente a diversas mutaciones de β -Gal asociadas a la gangliosidosis GM₁ en colaboración con los Prof. K. Higaki y Y. Suzuki de las Universidades de Tokio y Tottori.

4.6.1. Estudio de la actividad como inhibidores de glicosidasas lisosomales humanas de los derivados bicíclicos de DGJ.

Las alteraciones en la secuencia de aminoácidos de la β -Gal son originarias de un grupo de desórdenes entre los que se encuentran la gangliosidosis GM₁ (de carácter neuronopático) y la enfermedad de Morquio (de carácter no neuronopático). El bajo número de pacientes afectados (2% del total de LSDs) y la limitación de los recursos dedicados a la investigación sobre estas enfermedades contribuyen a que estos desórdenes se encuentren aún entre las enfermedades “huérfanas”, para las cuales actualmente no se dispone de tratamiento.

La evaluación *in vitro* de los derivados **29** y **30** frente a un panel de glicosidasas ácidas humanas confirmó el comportamiento de estos derivados como inhibidores específicos y potentes de β -Gal, con valores de IC₅₀ en el rango submicromolar o micromolar bajo, siendo inactivos frente a α -Gal A, α -Glcasa, β -Glcasa y N-acetil- β -glucosaminidasa.³ Además, la potencia de inhibición de **29** y **30** disminuyó un orden de magnitud al pasar de pH neutro (7.0) a pH ácido (5.5) para la misma enzima, un comportamiento favorable en compuestos candidatos a PC. Los resultados de los ensayos realizados han sido comparados con los obtenidos para NOEV (Figura 4.31),¹⁵ el mejor candidato a chaperona para la gangliosidosis GM₁ descrito hasta la fecha (Tabla 4.4).

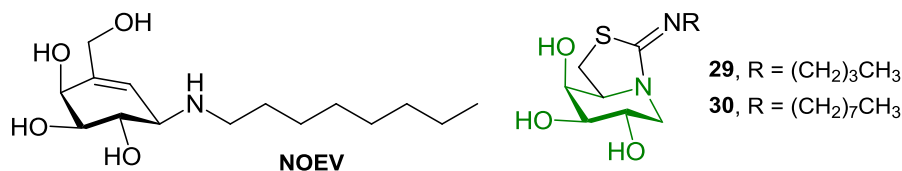


Figura 4.31. Estructura química del NOEV y de los derivados bicíclicos **29** y **30**.

Tabla 4.4. Comparación de la actividad como inhibidores de glicosidasas comerciales (K_i , μM) y lisosomales humanas (IC_{50} , μM) de los derivados bicíclicos de DGJ.^a

	Enzimas lisosomales humanas (pH 5.0/7.0, IC_{50} μM)		Enzimas comerciales (K_i μM)		
	α -Gal <i>H. s.</i>	β -Gal <i>H. s.</i>	α -Galasa (Café)	β -Galasa (<i>E. Coli</i>)	β -Galasa (Buey)
NOEV ¹⁵	n.i.	0.13/0.02	n.d.	n.d.	0.87
29	n.i.	32/3.1	n.i.	7.3	2.9
30	n.i.	6.0/0.5	n.i.	0.65	0.2

n. i. No se detectó inhibición. n.d. No determinado. ^aNinguno de los compuestos mostró inhibición frente a las enzimas lisosomales humanas α -Glcasa, β -Glcasa y *N*-acetil- β -glucosaminidasa.

En base a los datos comentados, los derivados **29** y **30** fueron seleccionados para la evaluación de su actividad chaperona en fibroblastos humanos de pacientes que presentaban la mutación homocigótica R201C en la β -Gal, una de las cinco mutaciones predominantes de la gangliosidosis GM_1 . Ambos compuestos incrementaron la actividad enzimática residual de la enzima mutante. En el caso de **30**, el incremento de actividad fue continuo en el rango de concentraciones entre 20 y 160 μM , mientras que para **29** un aumento en la concentración por encima de 20 μM fue desfavorable (Figura 4.32). Los estudios de citotoxicidad indicaron que el derivado **30** es tóxico a concentraciones superiores a 100 μM en fibroblastos humanos normales, mientras que **29** no mostró citotoxicidad a concentraciones hasta 640 μM . Por este motivo, y aunque el inhibidor más potente de β -Gal fue el derivado **30** (IC_{50} 6.0 μM), se optó por el derivado **29** para profundizar en la evaluación *in silico*, *in vitro* e *in vivo* del potencial como chaperona farmacológica para la gangliosidosis GM_1 .¹⁶

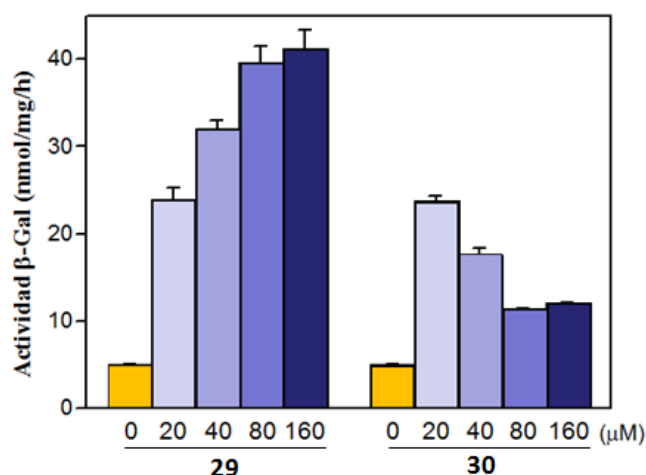


Figura 4.32. Actividad como chaperona de los derivados **29** y **30** en fibroblastos humanos mutantes (R201C) de pacientes de gangliosidosis GM₁. Cada barra representa la media de tres determinaciones.

4.6.2. Efectos del derivado **29** en β-Gal lisosomal humana *in vitro* e *in silico*.

En el apartado anterior, se presentaron los datos de la evaluación *in vitro* de la capacidad como inhibidor de glicosidasas lisosomales del derivado **29** empleando lisados de fibroblastos humanos normales. Este compuesto se comportó como un inhibidor potente y específico de la β-Gal humana (IC₅₀ 32 μM; Figura 4.33 A). Para evaluar la capacidad como chaperona del derivado **29**, se llevó a cabo en primer lugar un estudio *in vitro* sobre el efecto de **29** en la protección de β-Gal en un ensayo de degradación térmica inducida de la enzima. En ausencia de chaperona, la actividad enzimática de β-Gal disminuyó hasta el 20% después de 20 minutos y hasta el 10% después de 40 minutos de incubación a 48 °C. La presencia del derivado **29** redujo la degradación térmica de la enzima de manera dependiente de la concentración. La actividad enzimática de β-Gal sólo disminuyó un 10% después de 20 minutos y un 20% después de 40 minutos de

incubación de los fibroblastos normales en presencia de una disolución 80 μM del derivado **29** (Figura 4.33 B).

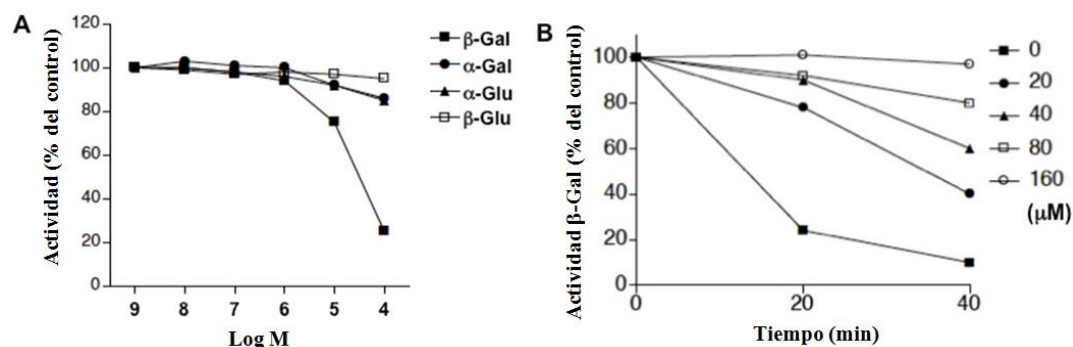


Figura 4.33. Perfil de inhibición del derivado **29** frente a enzimas lisosomales humanas y estudio de protección de β -Gal *in vitro*. A) Actividad de **29** como inhibidor de hidrolasas lisosomales en lisados de fibroblastos humanos normales. B) Efecto de **29** en la protección de β -Gal en ensayos de degradación térmica inducida a 48 $^{\circ}\text{C}$ y pH 7.0 en lisados de fibroblastos humanos normales. Los valores son relativos a la actividad enzimática en ausencia de chaperona como 100%.

Las bases moleculares para el diseño de PCs dirigidas al sitio activo de la enzima son aún poco conocidas. Cuando se inició este proyecto, no se disponía de la estructura cristalográfica de la β -Gal ni de complejos de la enzima con ligandos. Para estudiar la interacción de β -Gal con el derivado bicíclico **29**, se ha llevado a cabo un estudio *in silico* mediante modelización molecular. El análisis de este estudio indicó que la enzima acomoda el iminoazúcar en el sitio activo, que presenta una estructura terciaria de barril TIM α/β , en la que los segmentos de hélice α y de hoja β se alternan y se encuentran unidos mediante conexiones dextrógiras (Figura 4.34). La ausencia de hidroxilo anomérico permite que el sustituyente *n*-butilo se oriente hacia un bolsillo hidrofóbico situado a la entrada del sitio activo, confirmando así la hipótesis inicial de nuestro diseño.

Durante la elaboración de este trabajo, se publicó la estructura cristalográfica de la β -Gal y del correspondiente complejo con la DGJ.¹⁷ Los datos cristalográficos para

el complejo β -Gal:DGJ fueron prácticamente idénticos a los obtenidos para el complejo β -Gal:**29** mediante modelización molecular. De hecho, las dos estructuras son superponibles. Los datos apoyan que la formación del complejo β -Gal:**29** estabiliza la conformación de la enzima, de acuerdo con la disminución observada experimentalmente en la velocidad de degradación.

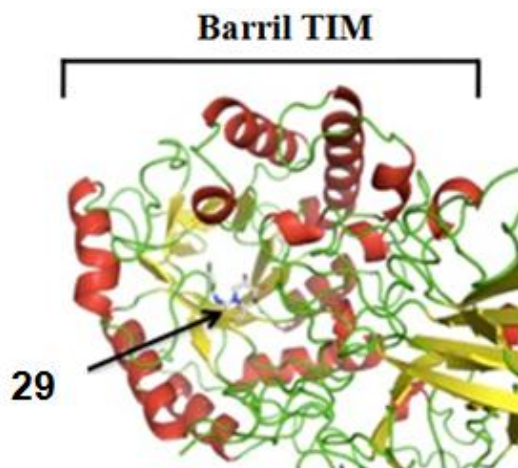


Figura 4.34. Predicción tridimensional del complejo β -Gal-**29** mediante simulación computacional. En la estructura de β -Gal, las cadenas de hélice α se representan en color rojo, las hojas β en color amarillo y los lazos en verde. En la estructura del derivado **29**, los átomos de carbono se representan en color blanco, los átomos de oxígeno en color rojo, los átomos de nitrógeno en color azul y el átomo de azufre en color amarillo.

4.6.3. Efecto chaperona del derivado **29** en fibroblastos intactos humanos.

El efecto chaperona de **29** se evaluó en fibroblastos intactos humanos procedentes de un sujeto sano y de ocho pacientes con mutaciones diferentes, en concreto las mutaciones heterocigóticas I51T/Y316C y I51T/R457Q y las mutaciones homocigóticas I51T, R59H, G190D, R201C, G438E y R457Q. Las células fueron incubadas durante 96 horas en presencia o en ausencia del derivado **29**. La medida de la actividad enzimática de β -Gal en lisados de fibroblastos indicó un aumento significativo de dicha actividad en las células afectadas por todas las mutaciones excepto por la mutación R59H (Figura

4.35). La actividad chaperona es especialmente notable en fibroblastos afectados por las mutaciones homocigóticas I51T y G438E, mutaciones frente a las cuales el derivado de referencia NOEV no mostró respuesta positiva en ensayos previos.¹⁸ En un experimento control, no se detectaron cambios en la actividad de las enzimas lisosomales α -Gal, α -Glc y β -Glc en células afectadas por la mutación homocigótica R201C después del tratamiento con **29**.

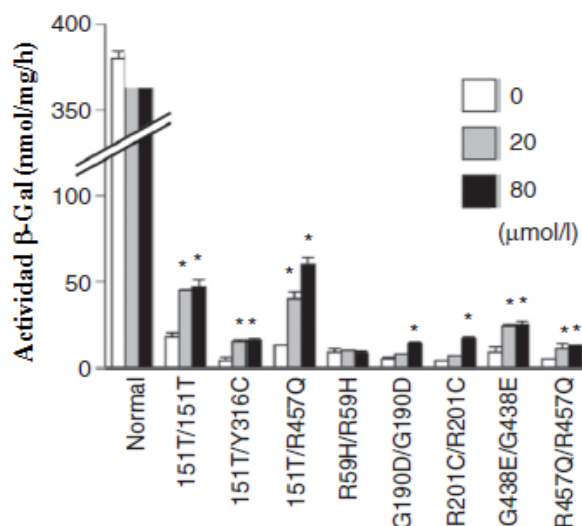


Figura 4.35. Efecto chaperona de **29** en fibroblastos intactos humanos que presentan deficiencia de β -Gal. Los fibroblastos de piel fueron incubados en presencia o en ausencia de **29** a las concentraciones indicadas durante 96 horas. La actividad enzimática de β -Gal fue medida en lisados de fibroblastos. Cada barra representa la media \pm SEM de tres determinaciones. * $P < 0.05$ significativos, valores estadísticamente diferentes a los obtenidos en ausencia de **29**.

4.6.4. Efecto chaperona del derivado **29** en células COS transfectadas.

Para determinar el perfil mutacional de actividad de **29**, se evaluó su actividad chaperona frente a un panel de células COS7 transfectadas con diferentes β -Gal mutantes, hasta un total de 88 mutaciones. La ventaja del estudio con células COS7 transfectadas es

la homogeneidad genética y el carácter homocigótico de las mutaciones. En este estudio, el tratamiento con **29** dio respuesta positiva en 24 de las 88 mutaciones evaluadas, 16 de las cuales no respondían al tratamiento con NOEV. Cabe destacar que las mutaciones frente a las que el derivado **29** sí provocó un aumento de la actividad enzimática incluyen cuatro de las mutaciones homocigóticas más comunes en la gangliosidosis GM₁ (I51T, R201C, R208C y R482H), convirtiendo al derivado **29** en un candidato excelente a PC para una mayoría de pacientes afectados por gangliosidosis GM₁ (Figura 4.36).

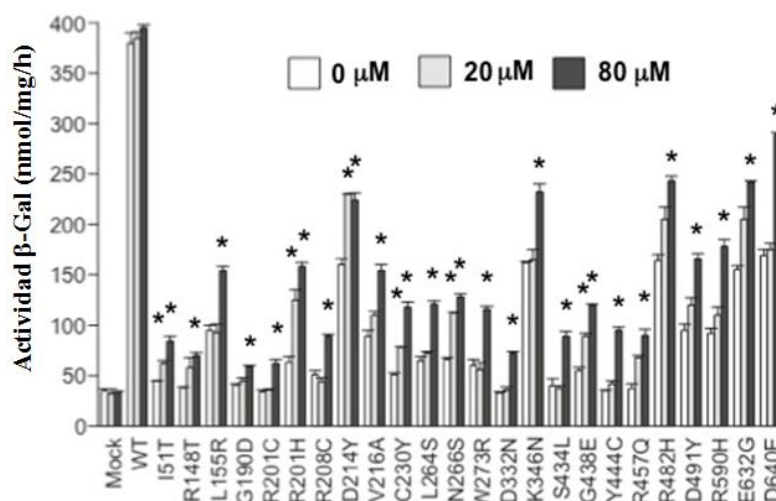


Figura 4.36. Efecto chaperona de **29** sobre una colección de β -Gal mutantes en células COS7. Las células COS7 fueron transfectadas con el gen que codifica β -Gal normal o β -Gal mutantes e incubadas en ausencia o en presencia de **29** durante 48 horas. La actividad enzimática se midió en lisados de fibroblastos. Cada barra representa la media \pm SEM de tres determinaciones. * $P < 0.05$ significativos, valores estadísticamente diferentes a los obtenidos en ausencia de **29**.

4.6.5. Efecto comparativo del derivado **29** y NOEV en la reducción de la acumulación del gangliósido GM₁ y de los niveles de proteínas asociadas a autofagosomas.

En la Figura 4.37 se muestran los resultados comparativos de la influencia de **29** y de NOEV en la actividad enzimática y en la concentración de GM₁ en fibroblastos de ratones que expresan β -Gal normal y mutante.¹⁹ El tratamiento con NOEV incrementó la actividad enzimática de β -Gal^{R201C} pero no la de β -Gal^{I51T},¹⁸ mientras que el derivado **29** fue efectivo frente a ambas mutaciones (Figura 4.37 A). Ninguno de los dos compuestos presentó respuesta positiva frente a células que no expresan la β -Gal (β -Gal^{-/-}). El tratamiento con **29** redujo significativamente la acumulación de gangliósido GM₁ en células afectadas por las mutaciones I51T y R201C pero no en células β -Gal^{-/-}. El derivado de referencia NOEV sólo fue efectivo en células afectadas por la mutación R201C (Figura 4.37 B).

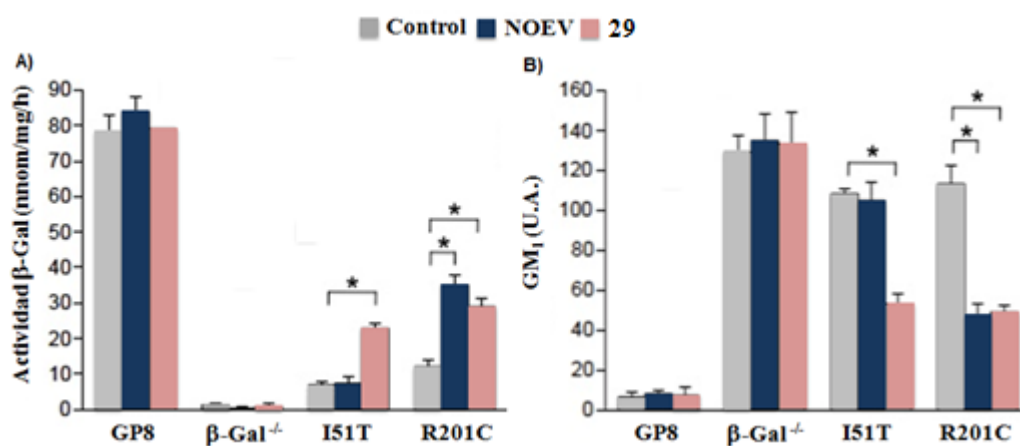


Figura 4.37. Efecto de **29** y de NOEV sobre la actividad enzimática (A) y la reducción del gangliósido GM₁ (B) en cultivos celulares de fibroblastos de ratones que expresan β -Gal normal (GP8) o β -Gal mutantes. * $P < 0.05$ significativos, valores estadísticamente diferentes a los obtenidos en ausencia de **29**.

Con objeto de comparar la capacidad de reducir la acumulación de GM₁, se han llevado a cabo además estudios de inmunovisualización utilizando una línea celular sana (GP8), dos mutantes (I51T y R201C) y una línea celular que no expresa la enzima β -Gal (β -Gal^{-/-}) pero a la que se le ha añadido el gangliósido GM₁. En el experimento control de la Figura 4.38 puede observarse la acumulación del gangliósido (verde) en las líneas celulares β -Gal^{-/-}, I51T y R201C y su ausencia en la línea celular normal. El tratamiento con NOEV suprime considerablemente la acumulación del sustrato GM₁ en la línea celular afectada por la mutación R201C, aunque no es efectivo en la línea celular afectada por la mutación I51T. En cambio, el tratamiento con el derivado **29** provoca una disminución significativa de los niveles de GM₁ en ambas líneas celulares, lo que indica su efectividad como PC frente a dos de las mutaciones más prevalentes de la GM₁.

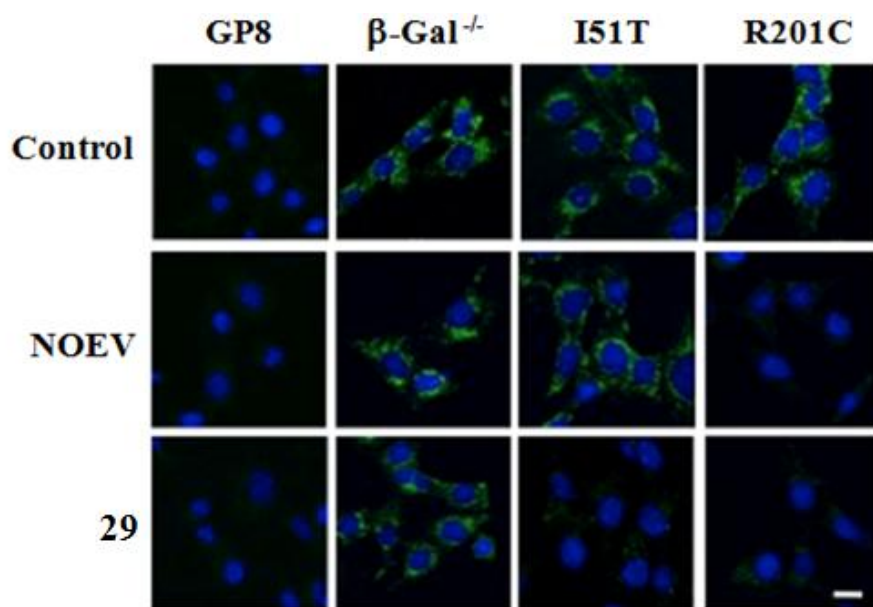


Figura 4.38. Efecto de **29** en la disminución de gangliósido GM₁ en cultivos celulares de fibroblastos de ratones que expresan β -Gal normal (GP8) o β -Gal mutantes. Las células fueron cargadas con gangliósido GM₁ y teñidas con anti-GM₁ Ab (verde) y DAPI (azul). Escala = 10 μ M. DAPI, 4,6-diamidino-2-fenilindol.

Para examinar la influencia de **29** y de NOEV en el proceso de autofagia, se ha llevado a cabo un estudio sobre los niveles de expresión de los marcadores LC3 (LC3-I y LC3-II) y p62 en lisados de las líneas celulares GP8, β -Gal^{-/-}, I51T y R201C procedentes de pacientes de gangliosidosis GM₁. Mientras que en la línea celular normal GP8 no se observó la presencia de los marcadores (Figura 4.39), sí fueron evidentes los niveles elevados de las proteínas LC3 (LC3-I y LC3-II) y p62 en las líneas celulares deficientes en β -Gal (β -Gal^{-/-}, I51T y R201C). Dichos niveles se redujeron significativamente en presencia de los derivados **29** y NOEV en la línea celular afectada por la mutación R201C. De acuerdo con los resultados obtenidos anteriormente, sólo el derivado **29** mostró una respuesta positiva frente a la línea celular I51T (Figura 4.39 A). El mismo resultado se obtuvo tras analizar las imágenes obtenidas de fibroblastos de ratones mediante microscopía confocal en las que se pudo observar la localización de las proteínas LC3 (color verde) en las distintas líneas celulares. En la Figura 4.39 B se observó la baja concentración de LC3 en la línea celular normal (GP8), que aumentó considerablemente en la línea celular I51T. Únicamente el tratamiento con **29** disminuyó considerablemente la expresión de las proteínas LC3 asociadas a los autofagosomas.

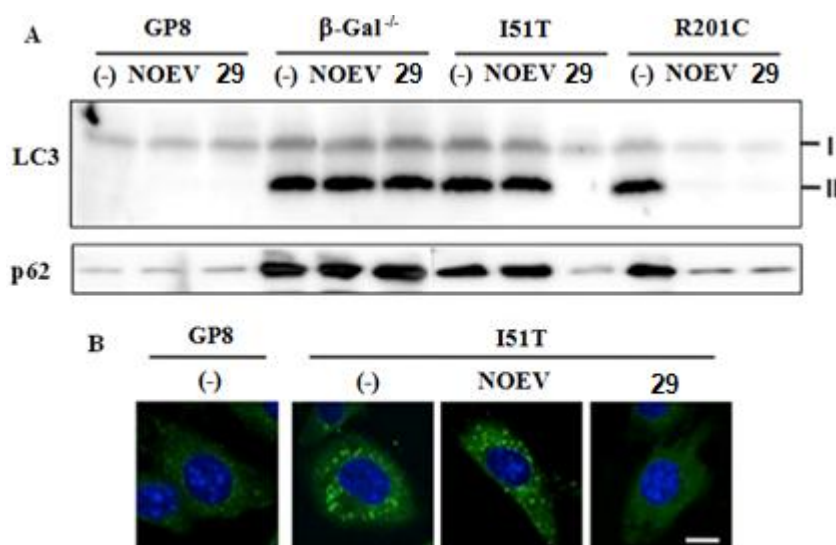


Figura 4.39. Efecto de **29** y NOEV en la reducción del nivel de expresión de proteínas asociadas a los autofagosomas en fibroblastos de ratones que expresan β -Gal mutantes. Las células fueron teñidas con anti-LC3 (verde) y DAPI (azul). Escala = 10 μ M. DAPI, 4',6-diamidino-2-fenilindol.

4.6.6. Efecto del derivado **29** en el cerebro de ratones que expresan β -Gal^{R201C}.

Algunos estudios sugieren que las chaperonas con bajo peso molecular podrían atravesar la barrera hematoencefálica y alcanzar el sistema nervioso central. Para obtener una prueba de este concepto con el derivado **29**, hemos utilizado un ratón transgénico modelo de la gangliosidosis GM₁ que expresa la β -Gal mutante R201C (edad: 7 meses). En un ensayo inicial, se administraron dosis bajas del derivado **29** (1 y 2 mmol/l) a los ratones y se encontró la duplicación de la actividad enzimática de β -Gal mutante en lisados procedentes del corazón, hígado y riñón, aunque este incremento de la actividad enzimática fue moderado (alrededor de 1.2 veces) en lisados procedentes del cerebro. Por ello, se decidió aumentar la dosis hasta concentraciones 5 y 10 mmol/l. La administración oral del derivado **29** a estas concentraciones incrementó de forma significativa la actividad de β -Gal mutante en lisados procedentes de la corteza cerebral y del cerebelo en

ratones afectados por la mutación R201C (Figura 4.40 A). La tinción de las células con un revelador del gangliósido GM₁ indicó una significativa reducción de GM₁ lisosomal en secciones de la corteza cerebral de los ratones tratados con **29** (Figura 4.40 B). Los niveles proteicos de LC3-II y p62 también se redujeron considerablemente en ratones afectados por la mutación R201C después del tratamiento con **29** (Figura 4.40 C). Estos resultados sugieren que el derivado **29** es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, alcanzar el cerebro y aumentar la actividad residual de β -Gal mutante R201C, así como mejorar las patologías neuronopáticas derivadas de la acumulación de GM₁ lisosomal, tras una administración oral.

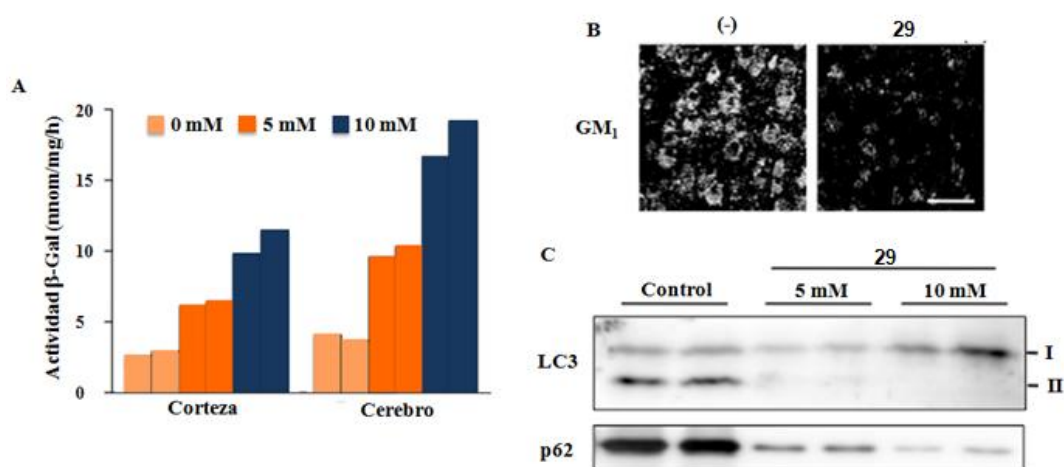


Figura 4.40. (A) Efecto de **29** en la actividad enzimática de β -Gal en lisados de fibroblastos procedentes de la corteza cerebral y del cerebro. (B) Secciones de la corteza cerebral de ratones R201C tratados con **29**. (C) Efecto de **29** en la expresión de proteínas asociadas a autofagosomas en el cerebro de ratones afectados por la mutación R201C.

4.6.7. Estudios estructurales de complejación con β -Gal humana recombinante y β -Gal mutantes.

Con objeto de profundizar en las bases estructurales de la interacción de los iminoazúcares con la β -Gal, se han determinado, en colaboración con el Prof. Y. Shimizu (Universidad de Tokio), las estructuras cristalinas de los complejos formados por la β -Gal recombinante y dos β -Gal mutantes (mutaciones R201C y I51T) con galactosa, DGJ, NOEV y algunos ejemplos de iminoazúcares sp^2 reductores y no reductores, tanto mono como bicíclicos (Figura 4.41).²⁰

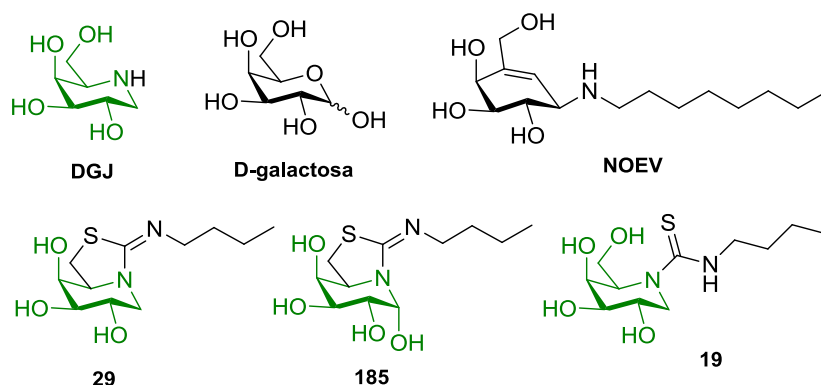


Figura 4.41. Estructura de los derivados incluidos en el estudio de complejación con la β -Gal combinante.

La galactosa, es el producto de hidrólisis de la α - y la β -Gal y ha sido descrita como posible chaperona para la GM₁ y la FD.²¹ Por otra parte, la DGJ, mimético de la galactosa, también se ha descrito como PC para FD²² aunque su falta de selectividad, común en los iminoazúcares clásicos, puede plantear dificultades para su uso terapéutico. El grupo del Prof. Suzuki y nuestro grupo de investigación han descrito el NOEV, un derivado de la valienamina, y la 6*S*-(*N*'-butiliminometiliden)-6-tio-1-desoxigalactonojirimicina, un derivado bicíclico de la DGJ (**29**, Figura 4.41), como PCs capaces de incrementar la actividad de β -Gal mutantes en cultivos celulares.^{22b,18a, 23}

Además, y con objeto de extraer conclusiones de estructura-actividad, se han incluido en este estudio dos iminoazúcares sp^2 estructuralmente relacionados con **29**, la 5-*N*,6-*S*-(*N'*-butiliminometiliden)-6-tiogalactonojirimicina (6S-NBI-GJ, **185**) y la *N*-(*N'*-butiltiocarbamoil)-1-desoxigalactonojirimicina (NBT-DGJ, **19**), que se comportan como PCs frente a la GlcCasa y la α -Gal A, respectivamente.³

El análisis tridimensional de las estructuras de los complejos enzima-iminoazúcar muestra que en todos los casos el anillo de iminoazúcar, o de la galactosa, se sitúa en el sitio activo de la β -Gal formando una red de enlaces de hidrógeno que implica los hidroxilos secundarios (OH-2, OH-3 y OH-4) y residuos de aminoácidos del sitio activo. En el caso del NOEV, la estructura del complejo con la β -Gal humana recombinante se muestra en la Figura 4.42. Además de la red de enlaces de hidrógeno mencionada, se establece un enlace de hidrógeno adicional entre el átomo de nitrógeno exocíclico (N-8 en la Figura 4.42) y el residuo de Glu188 de la β -Gal. Esta interacción no sólo contribuye a la estabilización del complejo, sino que también orienta la cadena de octilo hacia el bolsillo hidrofóbico situado a la entrada del sitio activo. Se establecen así interacciones hidrofobas que también son estabilizantes.

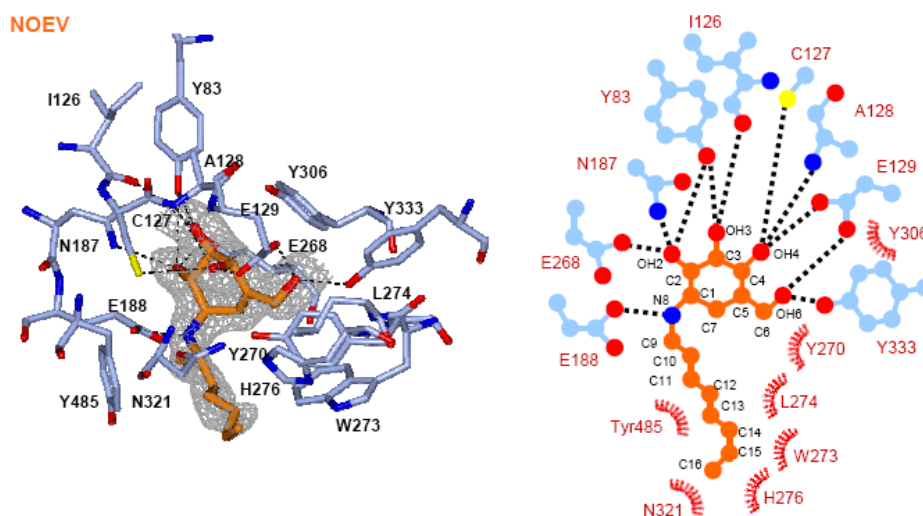


Figura 4.42. Interacciones entre la β -Gal humana recombinante y NOEV.

En el complejo del iminoazúcar bicíclico **29**, se observa, de manera análoga a lo comentado para el complejo con NOEV, un enlace de hidrógeno entre el nitrógeno exocíclico (N-8) y el residuo Glu188. Esta interacción fija la configuración *Z* del enlace imino (C=N) y orienta la cadena de butilo hacia el bolsillo hidrofóbico flanqueado por Tyr₄₈₅ y Trp₂₇₃. A diferencia del NOEV, donde el doble enlace endocíclico impone una conformación de semisilla en el anillo de valienamina, el anillo de piperidina de **29** adopta una conformación de silla, análoga a la de la galactosa en el complejo con la β -Gal, y el anillo de cinco miembros forma un ángulo de 110° respecto al anillo de piperidina (Figura 4.43). Debido a la ausencia de OH en la posición 6, la orientación de la cadena lateral de la tirosina 333, que en el caso del NOEV establecía un enlace de hidrógeno con el hidroxilo primario, se desplaza para ocupar el espacio correspondiente, siendo ésta característica única para el complejo **29**- β Gal.

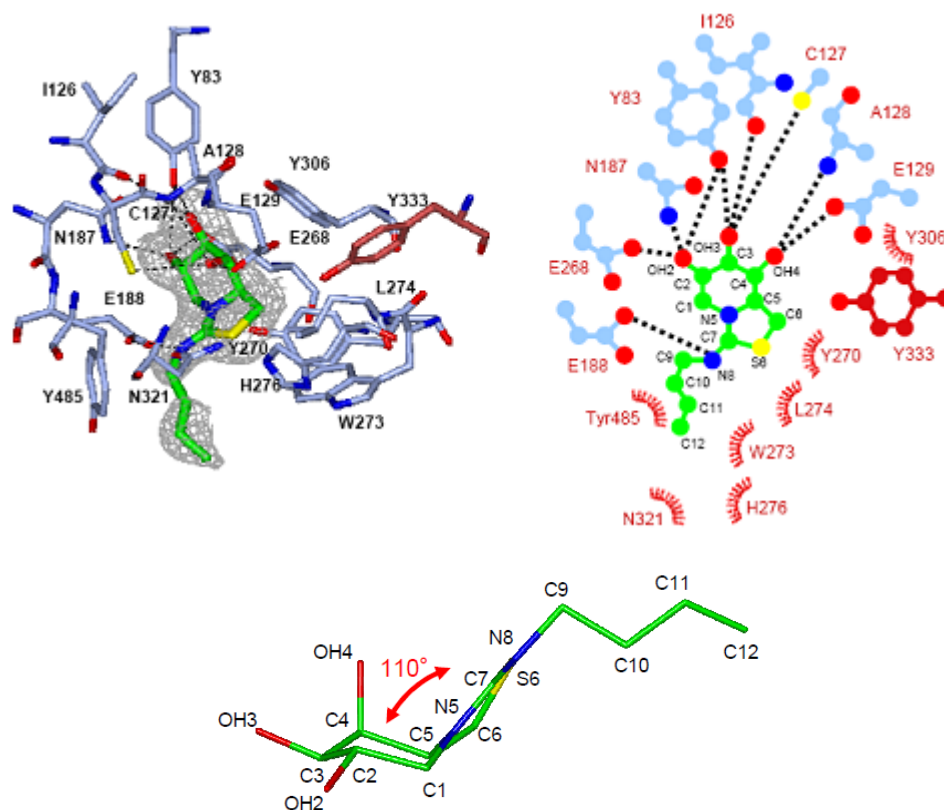


Figura 4.43. Interacciones entre la β -Gal humana recombinante y **29**.

La presencia de un OH adicional en la posición 1 de **185** condujo a una disminución significativa de la afinidad frente a β -Gal en comparación con **29**. De hecho, este iminoazúcar se comporta como inhibidor potente de GlcCasa y en disolución adopta una conformación de silla 4C_1 con el OH-1 en disposición axial (configuración α), de acuerdo con el efecto anomérico característico de los iminoazúcares sp^2 . Sin embargo, en el complejo con la β -Gal (Figura 4.44) se encuentra en la configuración opuesta, β , con el anillo de seis miembros en conformación próxima a 4E y el anillo de cinco miembros en el mismo plano. El OH-1 forma un enlace de hidrógeno con el residuo Glu188 en vez del

nitrógeno exocíclico (N-8) como en el caso del iminoazúcar **29**. El grupo imino C=N adopta la configuración *E* en el enlace, opuesta a la observada en el caso de **29**.

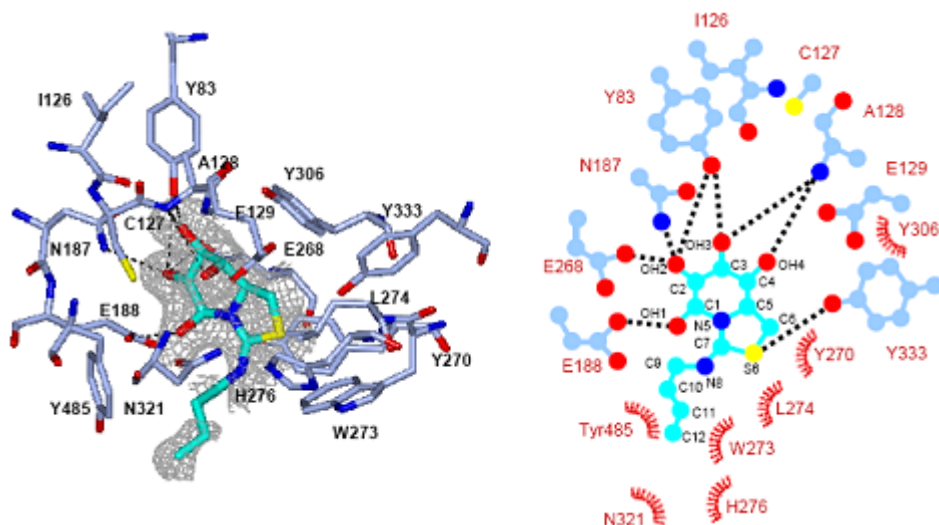


Figura 4.44. Interacciones entre la β -Gal humana recombinante y **185**.

En el caso del iminoazúcar monocíclico **19** se recupera la interacción por enlace de hidrógeno entre el OH primario y la Tyr333, como en el correspondiente complejo con el NOEV (Figura 4.45). Sin embargo, los átomos de nitrógeno (N8) y azufre (S7) exocíclicos no muestran interacción con la β -Gal, lo que está de acuerdo con la baja afinidad observada en los estudios de inhibición.

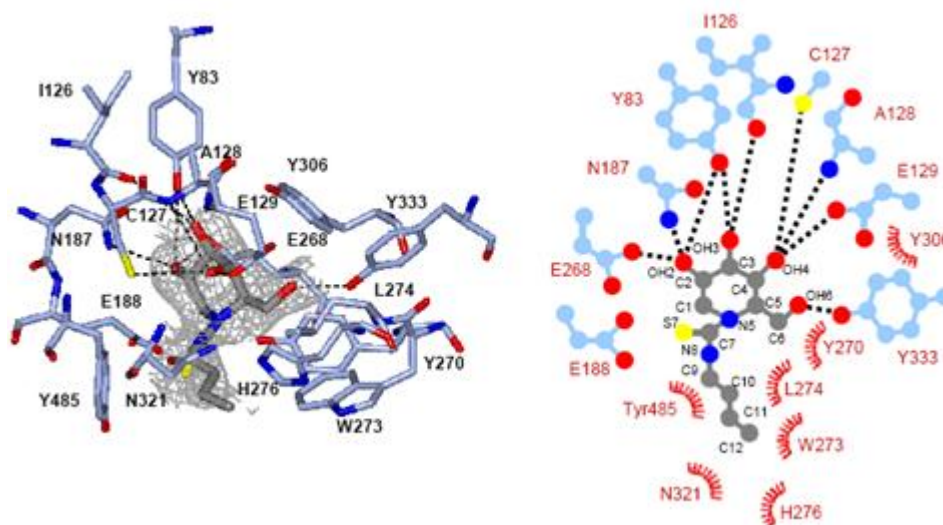


Figura 4.45. Interacciones entre la β -Gal humana recombinante y **19**.

Aunque **29** es un inhibidor de β -Gal más débil que NOEV, muestra una actividad chaperona muy significativa *in vitro* e *in vivo*. Este resultado confirma que el potencial de un ligando de sitio activo como PC depende del balance entre la actividad inhibitoria y chaperona, y no sólo de la primera. Aunque cabe esperar que ligandos con una afinidad mayor sean más eficaces para promover el plegamiento correcto de la glicosidasa mutante, una vez que el correspondiente complejo enzima-chaperona alcanza el lisosoma, no se produce la disociación, y no puede ocurrir el procesamiento del sustrato natural. El equilibrio de actividad inhibidor:chaperona depende de la concentración y generalmente alcanza su valor óptimo a concentraciones más bajas en el caso de inhibidores más potentes. Es interesante destacar también que NOEV y **29** muestran diferencias notables en su comportamiento como PCs hacia diferentes β Gal mutantes. Por ejemplo, mientras que NOEV es inactivo en fibroblastos con la mutación β Gal^{I51T}, **29** duplica la actividad de esta enzima a una concentración de 20 μ M. Sin embargo, la superposición de las estructuras cristalográficas de la enzima β -Gal mutante I51T complejada con **29**, D-galactosa o NOEV no mostró diferencias significativas ni en la disposición de los

iminoazúcares ni en la interacción de dichos ligandos con la enzima (Figura 4.46), lo que no nos permite identificar qué rasgos estructurales son los responsables de las diferencias de actividad observadas.

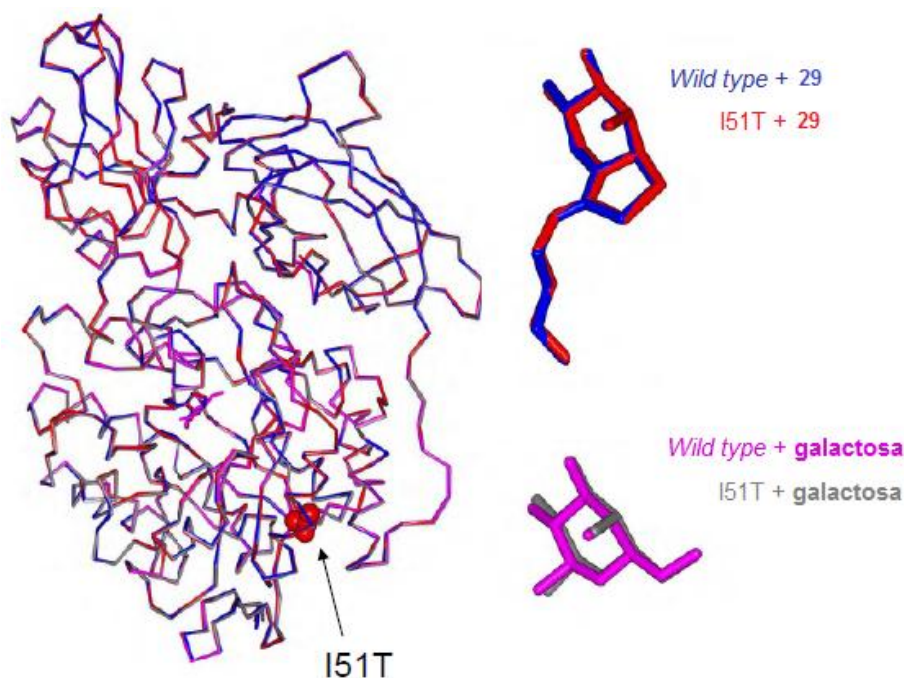


Figura 4.46. Estructura cristalográfica de β -Gal normal (*wild type*) y mutante (I51T) complejada con **29** y D-galactosa.

Es probable que la actividad de una chaperona de sitio activo no se deba exclusivamente a su capacidad de unirse a la enzima una vez correctamente plegada, como es el caso de la proteína cristalizada, sino también a la facultad de unirse a la proteína parcialmente plegada durante su biosíntesis. Es probable que en este estadio, las diferencias entre diferentes mutantes sean mayores. En el caso de **29**, la estructura del complejo con la β -Gal indica que la cadena de butilo no ocupa todo el bolsillo hidrofóbico a la entrada del sitio activo de la β -Gal. Además, la ausencia de OH-6 impide la interacción con Tyr333, lo que confiere al complejo una cierta flexibilidad en esa región en comparación con el NOEV. Es posible que ésto permita la unión a mutantes

como I51T en el estado parcialmente plegado y, consecuentemente, promover el plegamiento correcto.

El trabajo de investigación llevado a cabo en colaboración con el grupo de investigación de los Prof. Y. Suzuki y K. Ohno nos ha permitido discutir el efecto de la estructura de derivados de DGJ sobre la selectividad frente a α -Gal A o β -Gal *in vitro* e *in vivo* en fibroblastos humanos de pacientes o en células COS7. Los derivados monocíclicos, en concreto los que poseen un sustituyente de naturaleza aromática, mostraron una elevada especificidad por la α -Gal A mientras que los derivados bicíclicos se comportaron como inhibidores potentes de β -Gal. Los derivados monocíclicos han demostrado su comportamiento como PCs de potencia comparable con DGJ. En cambio, los resultados de los ensayos como chaperonas de los derivados bicíclicos de DGJ han demostrado incrementar la actividad residual de β -Gal, siendo útiles como PCs para la gangliosidosis GM₁. En concreto, el derivado **29** es capaz de incrementar de forma significativa la actividad de β -Gal^{R201C} en el cerebro de ratones modelos de dicha LSD, presentándose como un candidato potencial para el tratamiento de la gangliosidosis GM₁ en PCT.

¹ J. -Q., Fan, S. Ishii, N. Asano, Y. Suzuki, *Nat. Med.* **1999**, 5, 112-115.

² M. Aguilar-Moncayo, T. M. Gloster, J. P. Turkenburg, M. I. García-Moreno, C. Ortiz Mellet, G. J. Davies, J. M. García Fernández, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, 7, 2738-2747.

³ M. Aguilar-Moncayo, T. Takai, K. Higaki, T. Mena-Barragán, Y. Hirano, K. Yura, L. Li, Y. Yu, H. Ninomiya, M. I. García-Moreno, S. Ishii, Y. Sakakibara, K. Ohno, E. Nanba, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, Y. Suzuki, *Chem. Commun.* **2012**, 48, 6514-6516.

-
- ⁴ G. Schitter, E. Scheucher, A. J. Steiner, A. E. Stütz, M. Thonhofer, C. A. Tarling, S. G. Withers, J. Wicki, K. Fantur, E. Paschke, D. J. Mahuran, B. A. Rigat, M. Tropak, T. Wrodnigg, *Beilstein J. Org. Chem.* **2010**, *6*, 21.
- ⁵ B. L. Cantarel, P. M. Coutinho, C. Rancurel, T. Bernard, V. Lombard, B. Henrissat, *Nucleic Acid Res.* **2009**, *37*, D233.
- ⁶ C. S. Handloser, M. R. Chakrabarty, M. W. Mosher, *J. Chem. Education* **1973**, *50*, 510-511.
- ⁷ L. Grycová, R. Dommise, L. Pieters, R. Marek, *Magn. Reson. Chem.* **2009**, *47*, 977-981.
- ⁸ R. B. Moon, J. H. Richards, *J. Biol. Chem.* **1973**, *248*, 7276-7278.
- ⁹ a) R. J. Gillies, D. L. Morse, *Ann. Rev. Biomed. Eng.* **2005**, *7*, 287-326; b) B. D. Ross, G. K. Radda, D. G. Gadian, G. Rocker, M. Esiri, J. Falconer-Smith, *N. Engl. J. Med.* **1981**, *304*, 1338-1342.
- ¹⁰ a) Z. Luan, K. Higaki, M. Aguilar-Moncayo, L. Li, H. Ninomiya, E. Nanba, K. Ohno, M. I. García-Moreno, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, Y. Suzuki, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 2453-2464; b) M. Aguilar-Moncayo, M. I. García-Moreno, Arnold E. Stütz, J. M. García Fernández, Tanja M. Wrodnigg, C. Ortiz Mellet, *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 7439-7445.
- ¹¹ a) *Iminosugars as Glycosidase Inhibitors: Nojirimycin and Beyond*, ed. A. E. Stütz, Wiley-VCH, Weinheim, 1999; b) *Iminosugars: from Synthesis to Therapeutic Applications*, eds. P. Compain, O. R. Martin, Wiley-VCH, Weinheim, 2007.
- ¹² A. R. Sawkar, W. C. Cheng, E. Beutler, C. H. Wong, W. E. Balch, J. W. Kelly, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2002, **99**, 15428.
- ¹³ a) M. Chévrier, N. Brakch, C. Lesueur, D. Genty, Y. Ramdani, S. Moll, M. Djavaheri-Mergny, C. Brasse-Lagnel, A. Laquerrière, F. Barbey, S. Bekri, *Autophagy* **2010**, *6*, 589-599; b) F. M. Platt, B. Boland, A. C. van der Spoel, *J. Cell Biol.* **2012**, *199*, 723-734.
- ¹⁴ G. Parenti, *EMBO Mol. Med.* **2009**, *1*, 268-279.

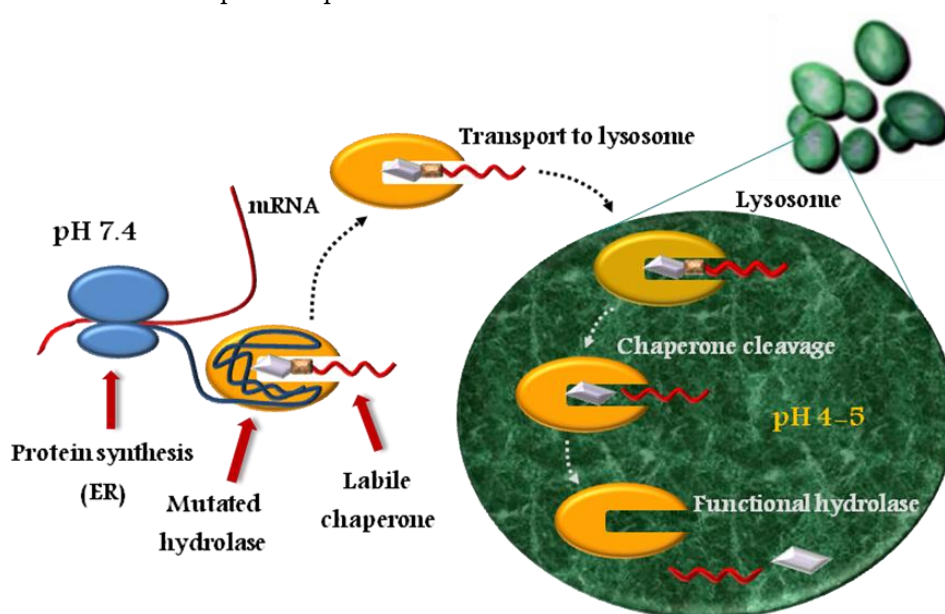
-
- ¹⁵ a) S. Ogawa, M. Kanto, Y. Suzuki, *Mini-Rev. Med. Chem.* **2007**, 7, 679; b) S. Ogawa, Y. K. Matsunaga, Y. Suzuki, *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, 10, 1967.
- ¹⁶ T. Takai, K. Higaki, M. Aguilar-Moncayo, T. Mena-Barragán, Y. Hirano, K. Yura, L. Yu, H. Ninomiya, M. I. García-Moreno, Y. Sakakibara, K. Ohno, E. Nanba, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, Y. Suzuki, *Mol. Ther.* **2013**, 21, 526-532.
- ¹⁷ U. Ohto, K. Usui, T. Ochi, K. Yuki, Y. Satow, T. Shimizu, *J. Biol. Chem.* **2012**, 287, 1801-1812.
- ¹⁸ a) K. Higaki, L. Li, U. Bahrudin, S. Okuzawa, A. Takamuram, K. Yamamoto, K. Adachi, R. C. Paraguison, T. Takai, H. Ikehata, L. Tominaga, I. Hisatome, M. Iida, S. Ogawa, J. Matsuda, H. Ninomiya, Y. Sakakibara, K. Ohno, Y. Suzuki, E. Nanba, *Hum. Mutat.* **2011**, 32, 843-852; b) H. Iwasaki, H. Watanabe, M. Iida, S. Ogawa, M. Tabe, K. Higaki, E. Nanba, Y. Suzuki, *Brain Dev.* **2006**, 28, 482-486.
- ¹⁹ J. Matsuda, O. Suzuki, A. Oshima, Y. Yamamoto, A. Noguchi, K. Takimoto, M. Itoh, Y. Matsuzaki, Y. Yasuda, S. Ogawa, Y. Sakata, E. Nanba, K. Higaki, Y. Ogawa, L. Tominaga, K. Ohno, H. Iwasaki, H. Watanabe, R. O. Brady, Y. Suzuki, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2003**, 100, 15912-15917.
- ²⁰ H. Suzuki, U. Ohto, K. Higaki, T. Mena-Barragán, M. Aguilar-Moncayo, C. Ortiz Mellet, E. Nanba, J. M. García Fernández, Y. Suzuki, T. Shimizu, **2013**, *enviado*.
- ²¹ A. Caciotti, M. A. Donati, A. d'Azzo, R. Salvioli, R. Guerrini, E. Zammarchi, A. Morrone, *Eur. J. Paediatr. Neurol.* **2009**, 13, 160-164.
- ²² a) A. I. Guce, N. E. Clark, J. J. Rogich, S. C. Garman, *Chem. Biol.* **2009**, 18, 1521-1526; b) Y. Suzuki, *Brain Dev.* **2013**, 35, 515-523.
- ²³ B. A. Rigat, M.B. Tropak, J. Buttner, E. Crushell, D. Benedict, J. W. Callahan, D. R. Martin, D. J. Mahuran, *Mol. Gen. Metab.* **2012**, 107, 203-2012.

Capítulo 5

Diseño de Chaperonas

Farmacológicas sensibles a pH ácido

Abstract. The development of new strategies to improve the chaperone activity of sp^2 iminosugars is a major goal in our research group. In this sense, the incorporation of biochemically controlled switchers in the structure of sp^2 iminosugars able to activate binding in the mutant enzyme in the ER and switch off it in the lysosome has been tested. In this chapter, we report the synthesis of a variety of orthoester groups, sensitive to pH, to be incorporated at the exocyclic substituent of DNJ, DGJ and calistegine B₂ sp^2 iminosugars and evaluated as glycosidase inhibitors. The present results demonstrate the possibility of exploiting this approach to increase their therapeutical potential towards Gaucher disease.



5. Diseño de chaperonas farmacológicas sensibles a pH ácido.

En la literatura podemos encontrar numerosos ejemplos de profármacos diseñados para liberar de forma controlada la especie farmacológicamente activa en el organismo. Los mecanismos de activación de los profármacos se pueden clasificar en enzimáticos o químicos. La eficacia de la activación *vía enzimática* dependerá en gran medida de la concentración de enzima efectiva en el tejido donde se activará el profármaco así como de la variabilidad de la concentración de enzima entre especies. Un ejemplo típico es la hidrólisis de la aspirina por medio de la acción de las enzimas intestinales para generar ácido salicílico, el cual está indicado en el alivio sintomático de los dolores ocasionales de leves a moderados y de la fiebre (Figura 5.1).

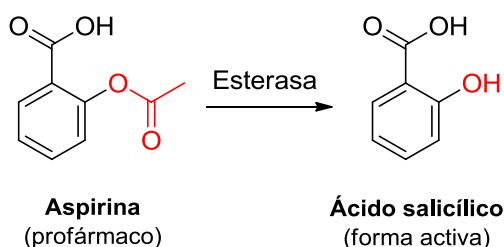


Figura 5.1. Activación de la aspirina por la acción de las enzimas intestinales.

En la activación de los profármacos *vía química*, la liberación espontánea de la especie activa está promovida habitualmente por un gradiente de pH. En este caso no tienen lugar los problemas derivados del polimorfismo genético. En cambio, la corta vida media del profármaco antes de alcanzar su sitio de acción se presenta en ocasiones como una limitación importante. Este tipo de activación es poco común y en la bibliografía existen muy pocos ejemplos de profármacos diseñados para ser activados exclusivamente *vía química*. Un ejemplo conocido de profármaco activado mediante esta vía es el omeprazol, un inhibidor de la secreción de ácido en el estómago. El omeprazol, un sulfóxido, sufre un reordenamiento promovido por el medio ácido en el estómago dando lugar a una sulfenamida, que es la forma activa (Figura 5.2).¹

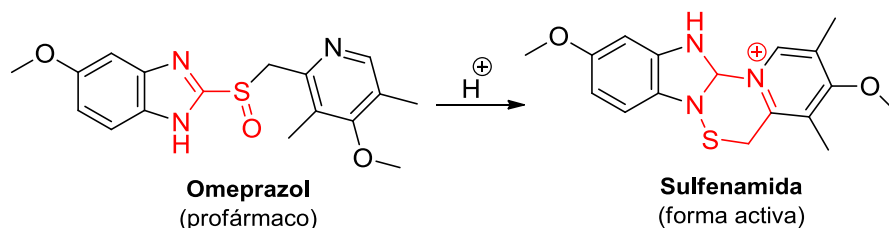


Figura 5.2. Activación del omeprazol en el medio ácido del estómago.

Mucho menos común es el uso de *profármacos* “*reversos*”. Se caracterizan por ser moléculas que presentan mayor actividad antes de sufrir alguna modificación en el organismo y que pierden su capacidad de acción después de la misma.

Aunque existe una batería de funcionalidades químicas que son inestables en medio fuertemente básico o ácido, sólo unas pocas muestran una velocidad de hidrólisis suficientemente elevada en medio ligeramente ácido y estabilidad en medio neutro. Algunos interruptores sensibles a pH ácido estudiados en este contexto incluyen hidrazonas,² *cis*-aconitilos,³ vinil éteres,⁴ acetales⁵ y ortoésteres⁶ (Figura 5.3). Los ortoésteres presentan tres grupos alcoxilos unidos a un átomo de carbono y constituyen una de las funcionalidades sensibles a ácido más fáciles de incorporar. Suelen emplearse como grupos protectores de ésteres y presentan la posibilidad de modular su velocidad de hidrólisis con el pH mediante modificaciones sencillas de aspectos estereoquímicos, esteroelectrónicos o estéricos.

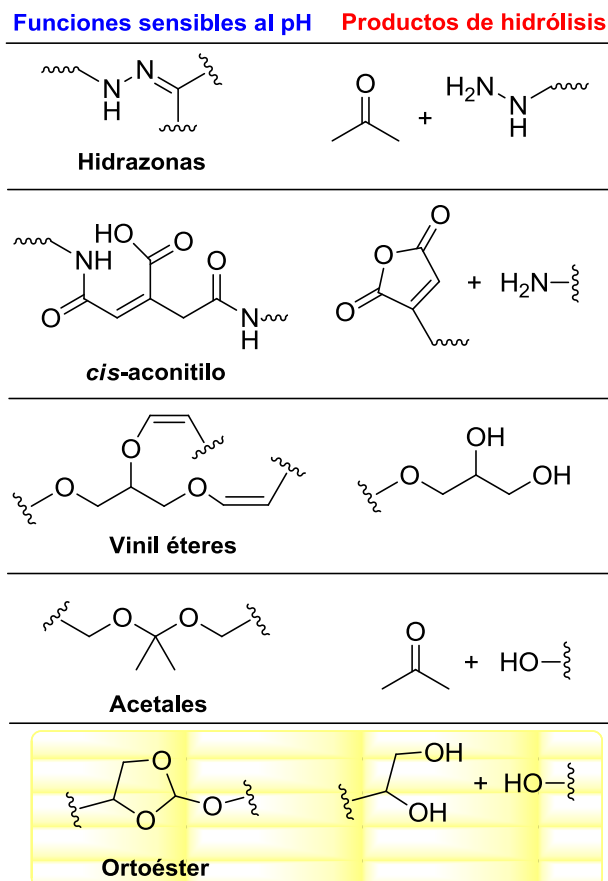


Figura 5.3. Ejemplos de funciones sensibles a pH ácido y productos de hidrólisis.⁷

El uso de polímeros que se degradan bajo condiciones ácidas⁷ como sistemas de transporte de fármacos o de material génico ha cobrado un gran interés en los últimos años, ya que permiten la liberación controlada de la carga una vez alcanzado el tejido tumoral o inflamado donde el pH es ligeramente ácido o, después que atravesar la membrana celular, en los endosomas o lisosomas ácidos. De hecho, el pH en los tejidos tumorales es 0.5-1.0 unidades menor que en los tejidos sanos⁸ y la variación es aún mayor entre el pH de la sangre o de los espacios extracelulares (7.2-7.4) en comparación con los compartimentos intracelulares (4.0-6.5). Esta diferencia de pH puede aprovecharse para

la preparación de sistemas que respondan a la diferencia de acidez con cambios en la solubilidad, configuración o conformación de dos modos diferentes. El primero consiste en la incorporación de grupos ionizables (bases o ácidos débiles)⁹ y la segunda aproximación consiste en el empleo de espaciadores degradables (Figura 5.4).

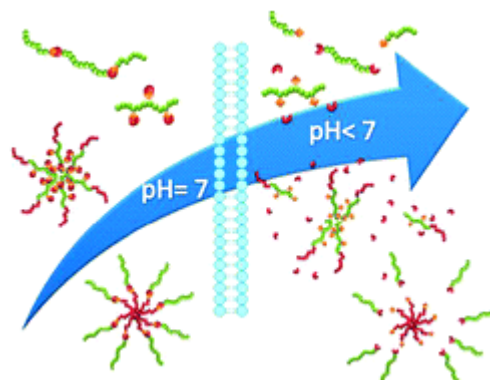


Figura 5.4. Representación del modo de acción de polímeros sensibles al cambio de pH.⁷

Hay numerosos ejemplos en la bibliografía en los que se describe el comportamiento, bajo condiciones ácidas, de distintos sistemas funcionalizados con grupos ortoésteres. Dado que la disminución de pH está asociada a muchos procesos fisiológicos y patológicos, tales como el proceso de endocitosis¹⁰ y el crecimiento de células tumorales¹¹ y de tejidos inflamatorios,¹² la incorporación de grupos ortoésteres en la estructura química de diversos derivados se ha dirigido siempre al diseño de profármacos que generen moléculas activas una vez que éstos alcanzan las células dianas debido a la acidez de las mismas. M. Bessodes *et al.*¹³ han descrito la síntesis y caracterización de una serie de polímeros de polietilenglicol (PEG) conjugados con lípidos y funcionalizados con ortoésteres cíclicos de cinco y seis miembros diseñados para estabilizar liposomas que transportan material bioactivo. La acidificación que tiene lugar durante el proceso de endocitosis¹⁰ da lugar a la hidrólisis de los grupos ortoésteres, provocando así la disociación del polímero del liposoma y la liberación en el medio intracelular del material para obtener la respuesta terapéutica deseada. La introducción de

variaciones estructurales en los conjugados, como modificaciones en el tamaño del anillo de ortoéster y sustituciones, generó un incremento de la velocidad de hidrólisis de varios órdenes de magnitud (Figura 5.5). Con el objetivo de estabilizar liposomas, F. C. Szoka *et al.*¹⁴ describieron unos años antes un conjugado PEG-lípido funcionalizado con un grupo diortoéster estable a pH neutro durante más de tres horas, pero que era degradado completamente después de una hora a pH 5.0 (Figura 5.5).

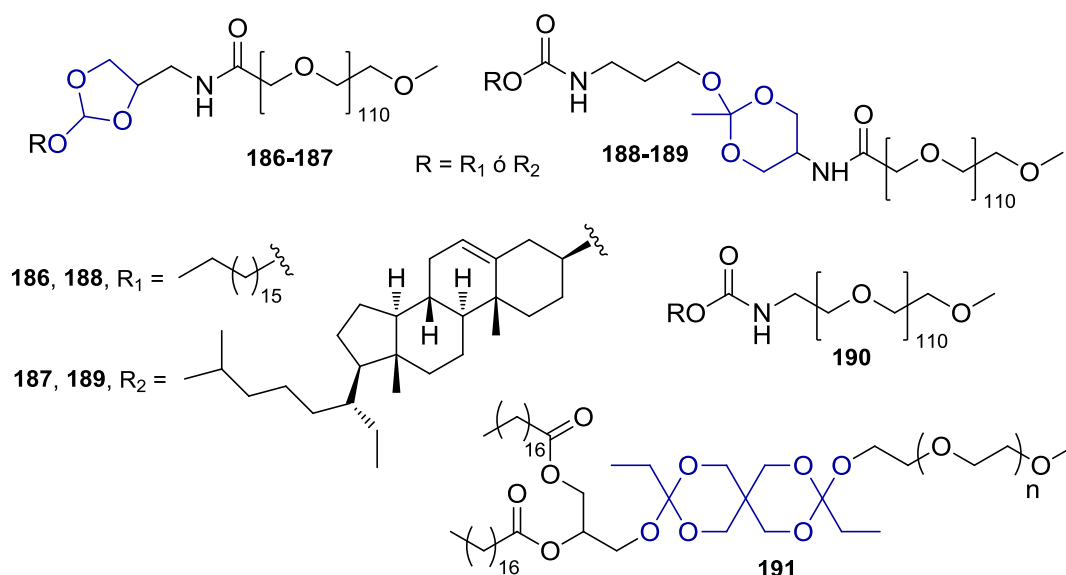


Figura 5.5. Polímeros funcionalizados con grupo ortoéster descritos por M. Bessodesy F.C. Szoka.

A. T. Jones *et al.*⁶ diseñaron, sintetizaron y determinaron la velocidad de hidrólisis de una serie de conjugados polímero-péptido (PEG-fenilalanina). Los autores destacaron que simples modificaciones químicas en el esqueleto del grupo ortoéster tenía una influencia importante sobre los perfiles de hidrólisis, lo que resulta bastante ventajoso en los casos en los que la activación de un profármaco debido a la acidificación del medio es fundamental (Figura 5.6).

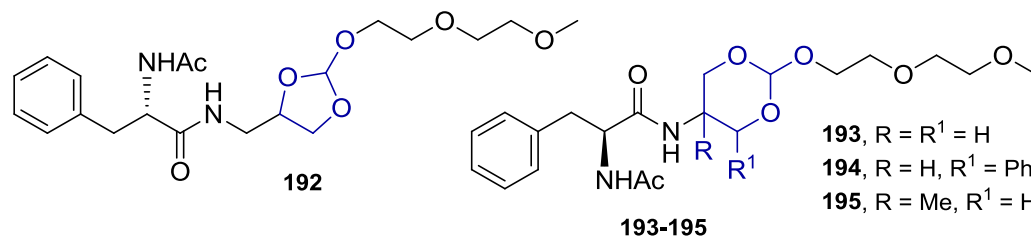


Figura 5.6. Conjugados PEG-fenilalanina funcionalizados con ortoésteres descritos por A. T. Jones.

Como se ha comentado en la Introducción General, una chaperona farmacológica debe unirse fuertemente y de forma reversible a la enzima en el RE, donde el pH es neutro, pero liberarse en presencia de una alta concentración de sustrato una vez que el complejo enzima-chaperona llega al lisosoma, donde el pH es ácido.¹⁵ De manera natural, nuestros compuestos ya presentan una afinidad hasta 50 veces mejor por GlcCasa al pH neutro del RE que al pH ácido del lisosoma.¹⁶ Para aumentar aún más esta relación, nos planteamos insertar una función biolábil que desactive el complejo con la enzima al llegar al lisosoma.

La presencia de sustituyentes lipófilos es favorable para la actividad chaperona tanto en el caso de iminoazúcares clásicos, por ejemplo en NN-DNJ, como en los iminoazúcares sp². En los segundos, la afinidad por la enzima depende críticamente de la presencia de este sustituyente. Dado que los datos de rayos X y de relaciones estructura-actividad obtenidos con anterioridad confirman que en esta región de la molécula es posible realizar modificaciones sin detrimento de la afinidad, nos propusimos insertar un interruptor biológico sensible a pH ácido en el sustituyente que se hidrolice en el lisosoma, provocando así una disminución de la afinidad de los iminoazúcares por la enzima en dicho orgánulo. Los compuestos así obtenidos se comportarían por tanto como *profármacos “reversos”* y representarían una nueva línea de investigación en la búsqueda de PCs más selectivas y eficaces (Figura 5.7).

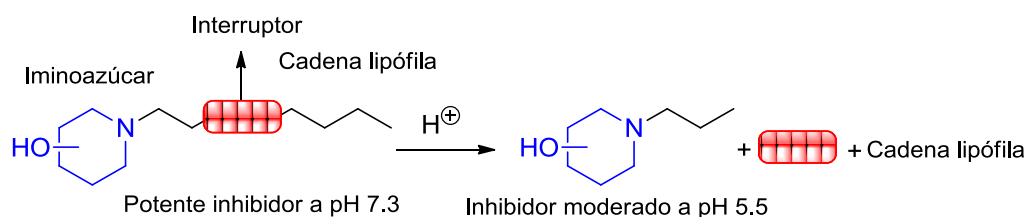


Figura 5.7. Representación de PCs como *profármacos* “reversos”.

Recientemente, nuestro grupo de investigación ha desarrollado derivados bicíclicos de la L-idonojirimicina, como la NOT-AIJ, que se comportaron como PCs frente a diferentes mutantes de la GlcCasa asociadas a GD. Empleando una concentración de 5 μ M de NOT-AIJ se observó un incremento de seis veces de la actividad residual de la GlcCasa humana normal y hasta un 8% en el caso de la enzima mutante L444P (Figura 5.8).¹⁷

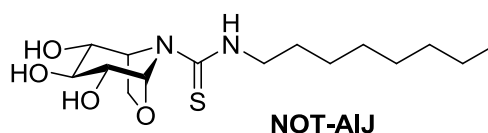
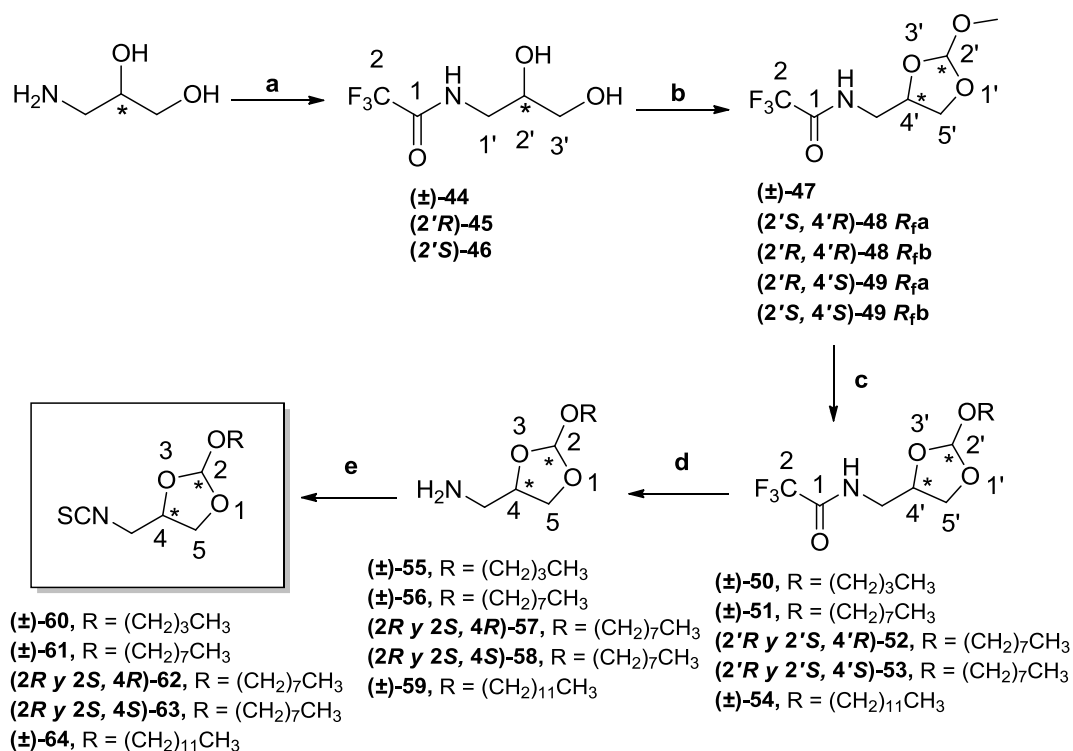


Figura 5.8. Estructura del derivado NOT-AIJ.

A la vista de estos antecedentes, nos hemos propuesto abordar la preparación de una serie de iminoazúcares anfifílicos funcionalizados con un grupo ortoéster como interruptor biológico con objeto de potenciar el efecto chaperona. Para explorar la viabilidad de la aproximación y su flexibilidad, hemos incluido en nuestro estudio tanto iminoazúcares clásicos (DNJ y DGJ) como iminoazúcares sp^2 relacionados con la familia de los *nor*-tropanos (calistegina B₂).

5.1. Preparación de isotiocianatos funcionalizados con grupo ortoéster.

Para la preparación de los nuevos conjugados de DNJ y DGJ sensibles a pH se ha utilizado en la etapa clave el acoplamiento amina-isotiocianato entre el correspondiente iminoazúcar y diferentes isotiocianatos provistos de un grupo ortoéster. La preparación de los isotiocianatos funcionalizados con ortoésteres se ha llevado a cabo siguiendo la estrategia sintética descrita por Bessodes *et al.*^{13,6} utilizando el 3-amino-1,2-diol como reactivo (Esquema 5.1). Se han preparado isotiocianatos con cadena de butilo, octilo y dodecilo utilizando el aminoalcohol en forma racémica (**60**, **61** y **54**, respectivamente). Además, y con objeto de evaluar la posible influencia de la configuración en el carbono central (C-2' en el aminoalcohol; C-4' en el ortoéster) en la actividad biológica, se prepararon los ortoésteres derivados de ambos enantiómeros del 3-amino-1,2-diol en el caso de la cadena de octilo (**62** y **63**). Hay que indicar que en la reacción de formación del ortoéster se genera un nuevo centro quiral, por lo que incluso en estos casos el producto final es una mezcla diastereoisomérica.

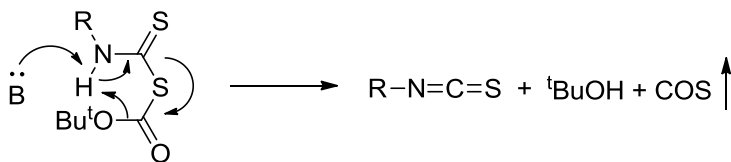


Esquema 5.1. Síntesis de isotiocianatos funcionalizados con grupo ortoéster. Reactivos y condiciones: a, Trifluoroacetato de etilo, THF, 2 h, 0 °C, 75-79%; b, Ortoformiato de trimetilo, PTSA, CH₂Cl₂, 2 h, t.a., 74-81%; c, ROH, *p*-toluensulfonato de piridinio, tolueno, 2 h, reflujo, 41-80%; d, NaOH 4 % (ac.), THF, 5 h, t.a., 44-82%; e, CS₂, Et₃N, Boc₂O, DMAP, EtOH, 45 min, t.a., 70-99%.

La protección del grupo amino del 3-aminopropano-1,2-diol comercial (racémico o de configuración 2*R* o 2*S*) en forma de trifluoroacetato usando trifluoroacetato de etilo dio lugar a las correspondientes trifluoroacetamidas **44-46** con excelentes rendimientos. El tratamiento de **44-46** con ortoformiato de trimetilo para originar los ortoésteres cíclicos de cinco miembros se llevó a cabo bajo catálisis ácida empleando ácido *p*-toluensulfónico (PTSA), pudiendo aislarse tanto el derivado racémico **47** como los cuatro diastereoisómeros en su forma stereoquímica pura **48-49** con rendimientos del 74-81%. La transesterificación usando el alcohol correspondiente (butanol, octanol y dodecanol)

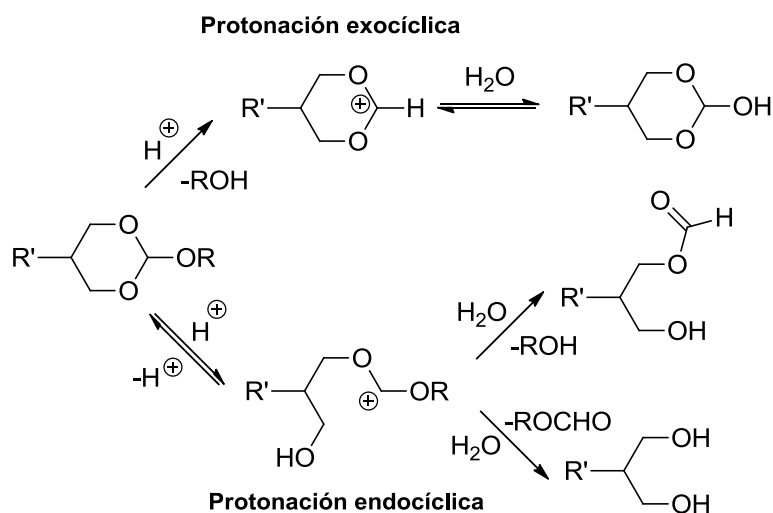
en condiciones anhidras y catalizada por *p*-toluensulfonato de piridinio, seguida de la desprotección del grupo trifluoroacetato empleando una disolución acuosa de NaOH, dio lugar a los ortoésteres intermedios **55-59** provistos de un grupo amino. El ensayo posterior de isotiocianación con tiofosgeno en una mezcla CH₂Cl₂-H₂O 1:1 a 0 °C no permitió obtener la función isotiocianato. En primera instancia, se decidió seguir una ruta alternativa que implicó el tratamiento de los grupos amino con TfN₃ en agua-MeOH, seguido del tratamiento con CS₂ y PPh₃ en dioxano durante 8 h a 40 °C para generar la función isotiocianato. Aunque este método resultó eficaz, supone una etapa adicional. Finalmente, el grupo isotiocianato se pudo generar directamente a partir de las aminas siguiendo la estrategia sintética descrita por Boas *et al.*,¹⁸ que emplea un exceso de CS₂ y Boc₂O en presencia de DMAP como catalizador.

La ruta sintética comentada para la isotiocianación es ventajosa tanto por la disminución en el número de etapas como por la simplicidad del tratamiento, que implicó únicamente la concentración de la mezcla de reacción ya que la mayoría de los subproductos formados durante la reacción son volátiles. La reacción de la amina con CS₂ da lugar al ditiocarbamato correspondiente que, tras el tratamiento con Boc₂O, conduce a un aducto inestable ditiocarbamato/carbonato, el cual evoluciona rápidamente al isotiocianato correspondiente originando *t*BuOH y sulfuro de carbonilo (COS) como subproductos. Se observó que la adición de cantidades catalíticas de DMAP incrementaron la velocidad de reacción considerablemente, con la formación inmediata de un gas visible de color amarillo pálido correspondiente a COS. Esta reacción se suele llevar a cabo empleando disolventes polares como EtOH o MeOH, aunque transcurre con la misma eficacia si se emplean disolventes más apolares como CH₂Cl₂ o THF (Esquema 5.2).



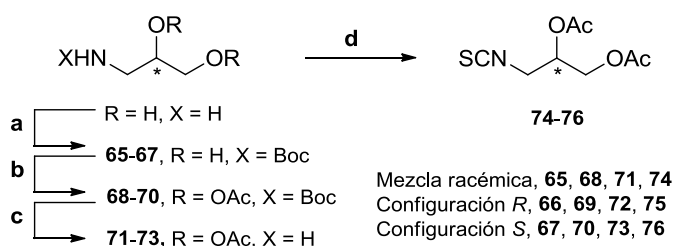
Esquema 5.2. Mecanismo propuesto por Boas para la síntesis bajo catálisis básica de isotiocianatos a partir de la amina correspondiente usando Boc_2O y DMAP.

A. T. Jones *et al.*⁶ han descrito dos vías diferentes de hidrólisis de los grupos ortoésteres dependiendo de la posición en la que tenga lugar la primera protonación y cuyas etapas se detallan en el Esquema 5.3 usando un derivado de seis miembros como modelo.



Esquema 5.3. Mecanismo de hidrólisis de los ortoésteres.

Con objeto de disponer de los derivados que resultarían tras la hidrólisis de los grupos ortoésteres en el ambiente ácido de los lisosomas (ver apartado 6.2), se ha llevado a cabo la preparación de los correspondientes isotiocianatos en su forma racémica (**74**) y enantioméricamente pura (**75** y **76** de configuración *R* y *S*, respectivamente). El tratamiento de los 3-aminopropano-1,2-dioles racémico y enantioméricamente puros con tiofosgeno para obtener el correspondiente grupo isotiocianato originó como producto único el tiocarbamato cíclico, por lo que se decidió proteger los grupos hidroxilos en forma de acetatos antes de la reacción de isotiocianación. Para ello, se llevó a cabo la protección del grupo amino en forma de carbamato empleando Boc_2O y Et_3N como catalizador (\rightarrow **65-67**) seguido del tratamiento con Ac_2O y piridina para dar lugar a los derivados **68-70** con rendimiento cuantitativo. La hidrólisis del grupo carbamato en condiciones ácidas empleando TFA seguida del tratamiento con tiofosgeno dio lugar a los derivados **74-76** (Esquema 5.4).

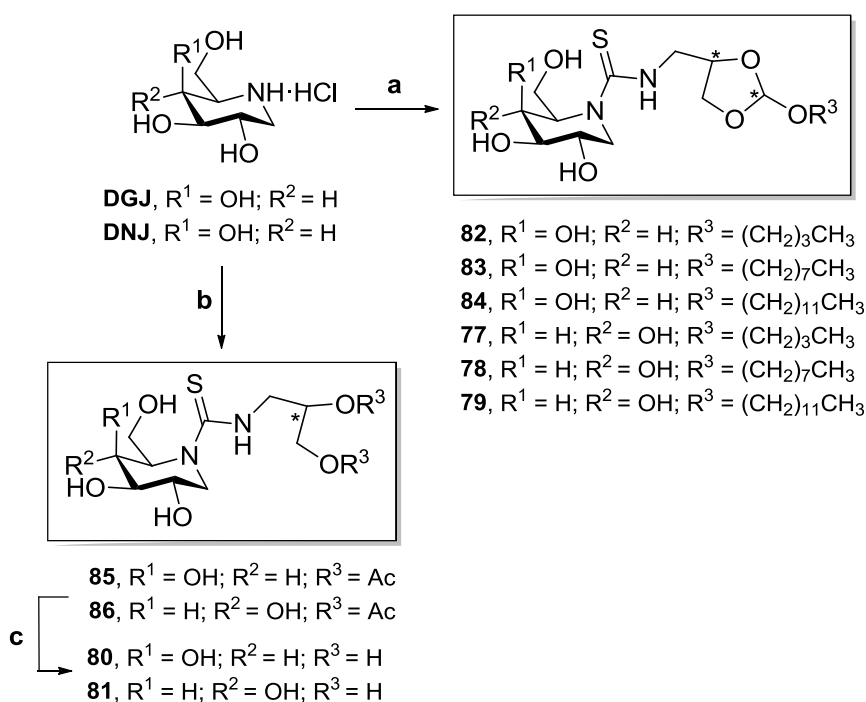


Esquema 5.4. Síntesis de isotiocianatos correspondientes a la hidrólisis del grupo ortoéster. Reactivos y condiciones: a, Boc_2O , DMF, Et_3N , t.a., 15 h, cuant.; b, Ac_2O , py, t.a., 12 h, cuant.; c, TFA- CH_2Cl_2 1:1, 0 °C, 30 min, cuant.; d, CSCl_2 , CaCO_3 , CH_2Cl_2 - H_2O 1:1, 0 °C, 1 h, 39-49% (84-94% en base a la recuperación de producto de partida).

5.2. Preparación de iminoazúcares sp^2 derivados de DNJ y DGJ funcionalizados con una función ortoéster.

El acoplamiento de los hidroccloruros de DNJ y DGJ con los isotiocianatos funcionalizados con un grupo ortoéster derivados del 3-aminopropano-1,2-diol en forma

racémica y cadenas de butilo, octilo y dodecilo, descritos en el apartado anterior, se llevó a cabo en piridina y en presencia de Et_3N como catalizador y nos permitió acceder a una colección de iminoazúcares sp^2 , como mezclas de diastereómeros en los carbonos C-2' y C-4' del anillo de cinco miembros, con buenos rendimientos (70-79%). Con objeto de disponer de muestras de referencia para los productos que resultarían tras la hidrólisis ácida, se prepararon además los conjugados de la DNJ y la DGJ con el isotiocianato **74** (\rightarrow **80** y **85**), que tras desacetilación condujeron a los derivados libres **81** y **86** con rendimientos de buenos a excelentes. La eficacia de la estrategia sintética empleada nos ha permitido acceder a ambas familias de derivados de DNJ y DGJ para evaluar la influencia de la naturaleza del sustituyente pseudoaglicónico sobre las propiedades de inhibición de glicosidasas a pH neutro y ácido (Esquema 6.5).



Esquema 5.5. Síntesis de iminoazúcares sp^2 sensibles a pH ácido derivados de DNJ y DGJ. Reactivos y condiciones: a, RNCS, py, Et_3N , t.a., 18 h, 70-79%; b, RNCS, py, Et_3N , t.a., 18 h, 68-81%; c, MeONa 1 M, MeOH, t.a., 1 h, 86-99%.

Las estructuras de los nuevos iminoazúcares sp^2 derivados de DNJ y DGJ se confirmaron mediante experimentos de 1H y ^{13}C RMN, EM y análisis elemental. En el caso de los derivados provistos de la función ortoéster, podemos observar una señal alrededor de 5.8 ppm (en 1H RMN) y otra sobre 117 ppm (en ^{13}C RMN) correspondientes al protón y carbono de la función ortoéster (C-10 en la Figura 5.8). Ambas señales están ausentes en los espectros registrados para los derivados con función *vic*-diol terminal, que no contienen un grupo ortoéster (Figura 5.10). En ambas familias de derivados, se observa una señal alrededor de 185 ppm correspondiente al carbono tiocarbonílico (CS) del grupo tiourea. En los espectros de 1H RMN, los valores de las constantes de acoplamiento alrededor del anillo de piperidina sugieren una conformación de silla 4C_1 tanto para los derivados de configuración D-*gluco* como D-*galacto* (Figuras 5.9 y 5.10).

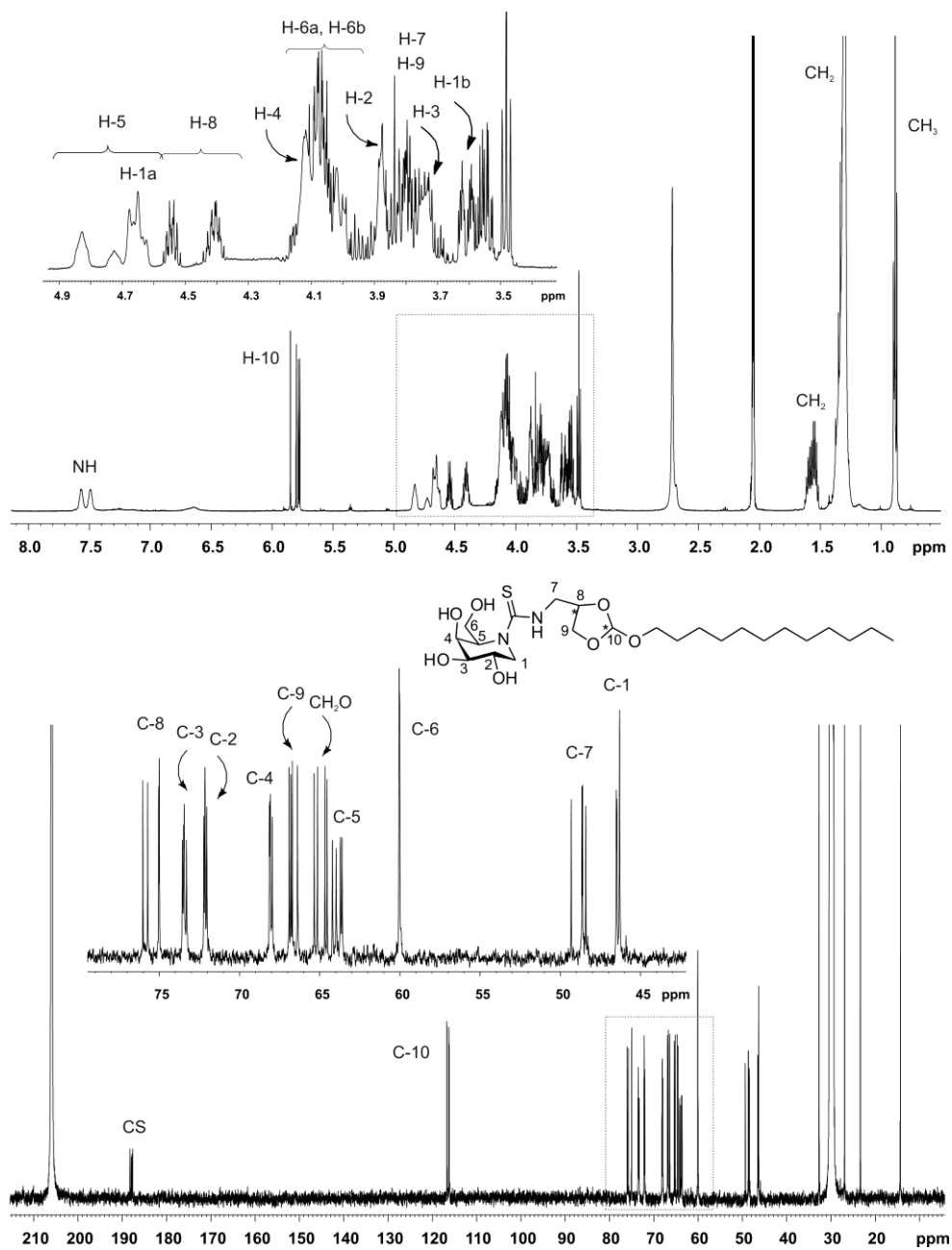


Figura 5.9. Espectros de ^1H y ^{13}C RMN (500 MHz, 125.7 MHz, 9:1 acetona- d_6 /D $_2$ O, 313 K) de **79**.

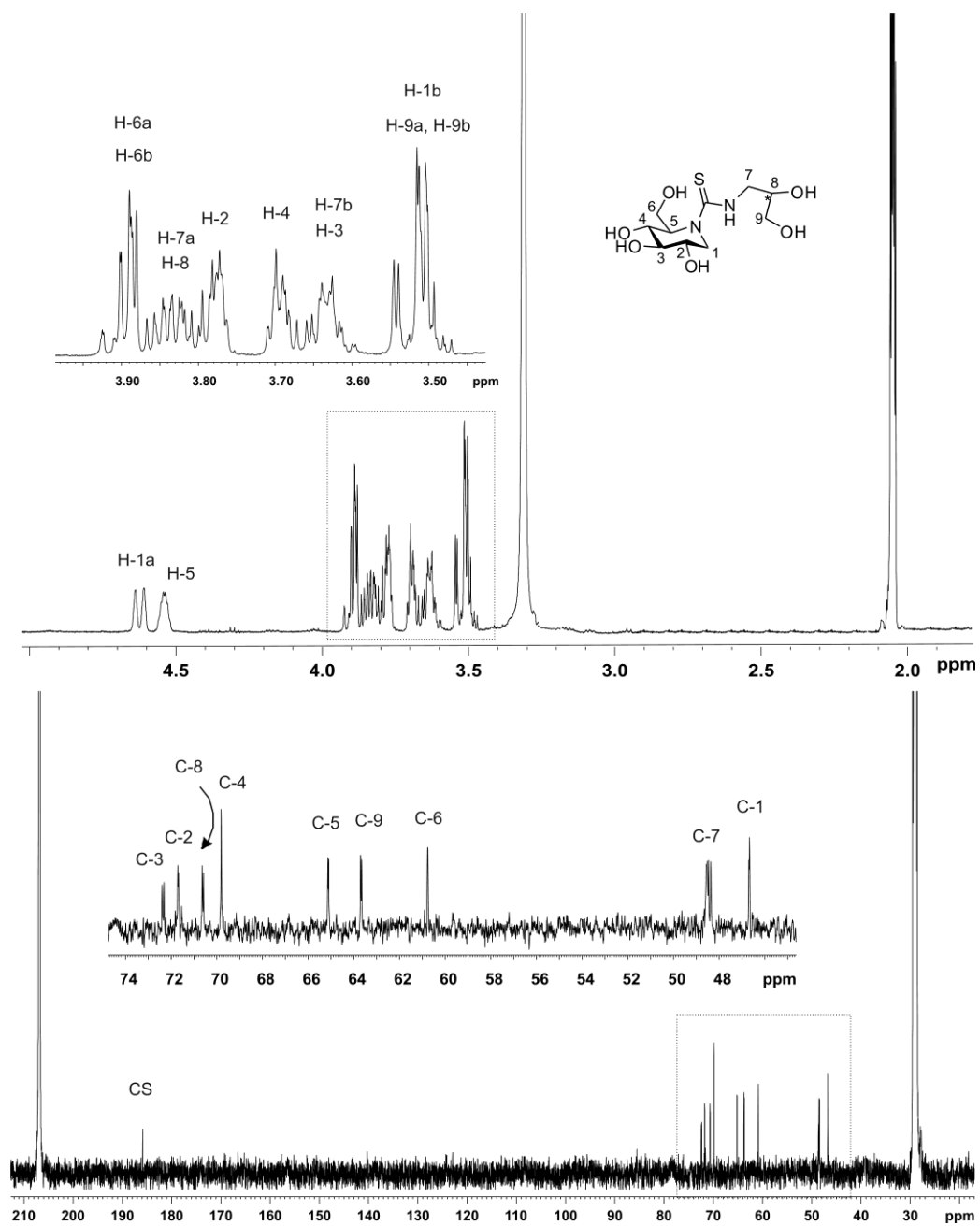


Figura 5.10. Espectros de ^1H y ^{13}C RMN (500 MHz, 125.7 MHz, 9:1 acetona- d_6 /D $_2$ O, 313 K) de **81**.

La evaluación como inhibidores de los nuevos iminoazúcares sp^2 se llevó a cabo en nuestro laboratorio frente a un panel de glicosidasas comerciales y los correspondientes valores de K_i (μM) se muestran en las Tablas 5.1 y 5.2. Los iminoazúcares derivados de DNJ se comportaron como inhibidores potentes y selectivos de β -Glcasa de almendra a pH 7.3 en el rango micromolar (5.7-21 μM), disminuyendo su capacidad como inhibidores de la misma enzima a pH 5.5 (53-185 μM). El derivado más potente como inhibidor de β -Glcasa de almendra de esta serie de compuestos fue **78**, que incorpora una cadena de *n*-octilo, presentando un valor de K_i 5.7 μM . Un aumento de la longitud de la cadena lipófila provocó una disminución en la afinidad por la enzima así como de la solubilidad en agua (Tabla 5.1).

Tabla 5.1. Comparación de la actividad como inhibidores de glicosidasas (K_i , μM) para los derivados de DNJ.^a

ENZIMAS	77	78	79	81
α-Glcasa				
Isomaltasa	17	129	18	n.i.
Amiloglucosidasa	175	101	151	340
β-Glcasa				
Almendra pH 7.3	21	5.7	16	77
Almendra pH 5.5	155	53	185	303
Naringinasa	57	61	94	91
β-Galasa				
Hígado de buey	70	35	7.4	116

n. i. No se detectó inhibición. n.d. No determinado. ^aNinguno de los compuestos mostró inhibición frente a la enzima α -Glcasa (levadura), β -Galasa (*E. Coli*), α -Galasa (grano de café verde), trehalasa (riñón de cerdo), α -Manasa (judía Jack) y β -Manasa (*Helix pomatia*).

Teóricamente, la actividad de los derivados **77-79** a pH ácido debería coincidir con la de **81** si se hubieran hidrolizado por completo en las condiciones del ensayo (30 min). Podemos observar que la actividad enzimática de la β -*Glcasa* de almendra a pH 5.5 es aproximadamente la mitad para los derivados **77-79** respecto al derivado **81**, lo cual indica que la hidrólisis no es completa después de 30 minutos. En cambio, la actividad de las β -*Glcasas* de almendra y de hígado de buey a pH 7.3 es mucho menor que a pH 5.5 en presencia de los derivados **77-79**, lo cual pone de manifiesto que la hidrólisis del grupo ortoéster es mucho menor a pH neutro que a pH ácido (Tabla 5.1).

Los iminoazúcares sp^2 derivados de DGJ **82-84** se comportaron como inhibidores potentes y selectivos de α -*Galasa* de café a pH neutro en el rango submicromolar, presentando valores de K_i 0.11 μ M, 0.16 μ M y 1.1 μ M, respectivamente. La hidrólisis del grupo ortoéster de estos tres derivados originaría el derivado **86**, el cual presentó una afinidad 10 veces menor por la enzima α -*Galasa* (K_i 2.7 μ M a pH 5.5; Tabla 5.2). Al igual que para los derivados de DNJ, la actividad de los derivados **82-84** no coincide con la de **86**. La actividad de la α -*Galasa* de café a pH 6.8 se reduce al 90% en presencia de los derivados **82-84** respecto a la actividad de dicha enzima a pH 5.5 en presencia del derivado **86**, lo cual indica que la hidrólisis del grupo ortoéster no es total en las condiciones del ensayo enzimático. La menor actividad de la α -*Galasa* de café a pH neutro que a pH ácido en presencia de los derivados **82-84** es indicativo de una hidrólisis del grupo ortoéster más lenta a pH neutro.

Tabla 5.2. Comparación de la actividad como inhibidores de glicosidasas (K_i , μM) para los derivados de DGJ.^a

ENZIMAS	82	83	84	86
β-Glcasa				
Almendra pH 7.3	2.2	2.8	9.3	94
Almendra pH 5.5	19	46	49	475
α-Galasa				
Grano verde de café pH 6.8	0.11	0.16	1.1	0.27
Grano verde de café pH 5.5	0.47	0.70	1.7	2.7
β-Galasa				
Hígado de buey	36	11	35	n.i.

n. i. No se detectó inhibición. n.d. No determinado. ^aNinguno de los compuestos mostró inhibición frente a la enzima α -Glcasa (levadura), isomaltasa (levadura), amiloglucosidasa (*Asp. Níger*), trehalasa (riñón de cerdo), naringinasa (*Penicilium decumbens*), β -Galasa (*E. Coli*), α -Manasa (judía Jack) y β -Manasa (*Helix pomatia*).

En colaboración con los grupos de los Prof. Y. Suzuki y K. Higaki, se ha llevado a cabo un estudio de la actividad de los derivados de DNJ **77-79** y **81** frente a glicosidasas humanas en comparación con el ABX, un inhibidor de GlcCasa de tipo no-glicomimético que se encuentra bajo investigación como PC para GD.¹⁹ En la Figura 5.11 se compara la actividad como inhibidores frente a la GlcCasa de los candidatos seleccionados a pH ácido (pH 5.5) y neutro (pH 7.0). Salvo el derivado hidrolizado **81**, los derivados de DNJ equipados con un grupo ortoéster mostraron una mayor actividad inhibitoria que el ABX para ambos valores de pH. El hecho de que no se observen diferencias significativas en la actividad de GlcCasa entre ambos valores de pH puede deberse a una hidrólisis parcial en las condiciones del ensayo.

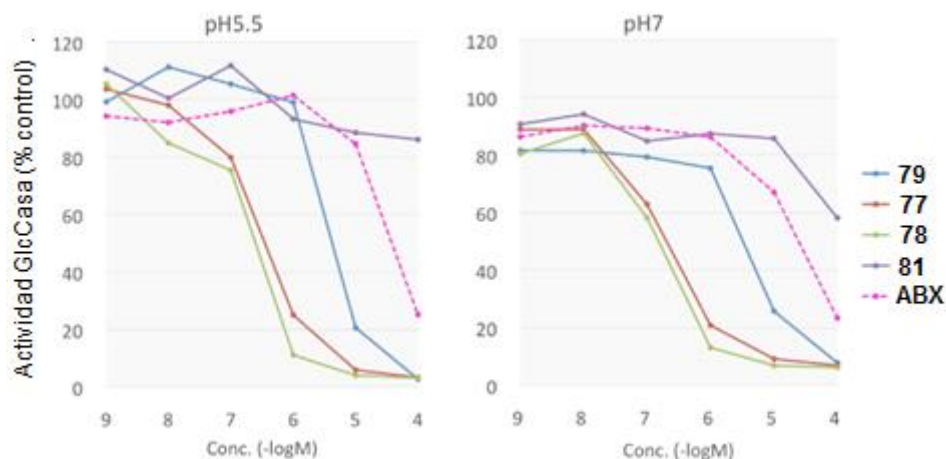


Figura 5.11. Comparación de la actividad inhibitoria de los derivados **77-79**, **81** y el Ambroxol frente a la GlcCase a diferentes valores de pH.

El estudio comparativo posterior de la actividad chaperona se llevó a cabo usando fibroblastos humanos sanos y de pacientes de GD expresando mutaciones diferentes. Es interesante destacar que el derivado **77** resultó activo frente a varias glucocerebrosidasas mutantes, mostrando un incremento significativo frente a las mutaciones neuronopáticas L444P y N188S (Figura 5.12). Después de cultivar los fibroblastos durante 5 días en ausencia y en presencia de concentraciones crecientes de ABX y de los derivados de DNJ, se procedió al lisado y a la determinación de la actividad usando 4-MU como sustrato. En el caso de los iminoazúcares **78** y **79**, se observó una disminución de la actividad a partir de $0.2 \mu\text{M}$, lo que indica que a partir de esa concentración la actividad inhibitoria supera a la chaperona. En contraste, en el caso de **77**, la actividad de la enzima mutante con las mutaciones heterocigótica N188S/G193W y homocigótica L444P/L444P mostró un incremento dependiente de la dosis en el rango utilizado ($0.2\text{-}20 \mu\text{M}$), confirmando un balance favorable de la actividad chaperona frente a la actividad como inhibidor.

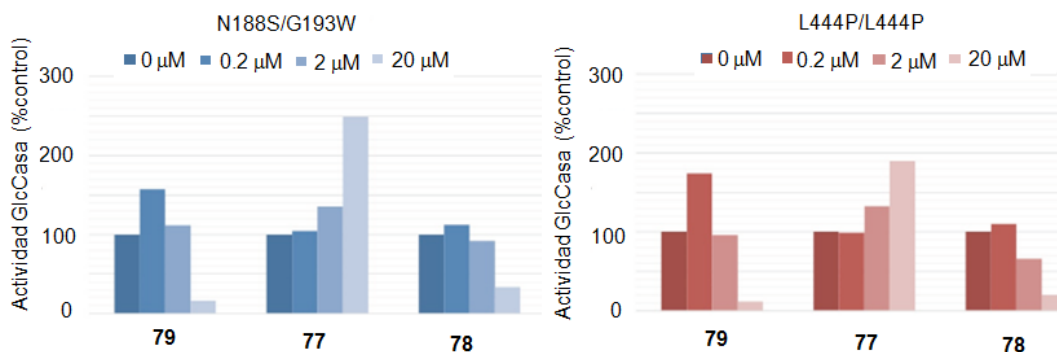
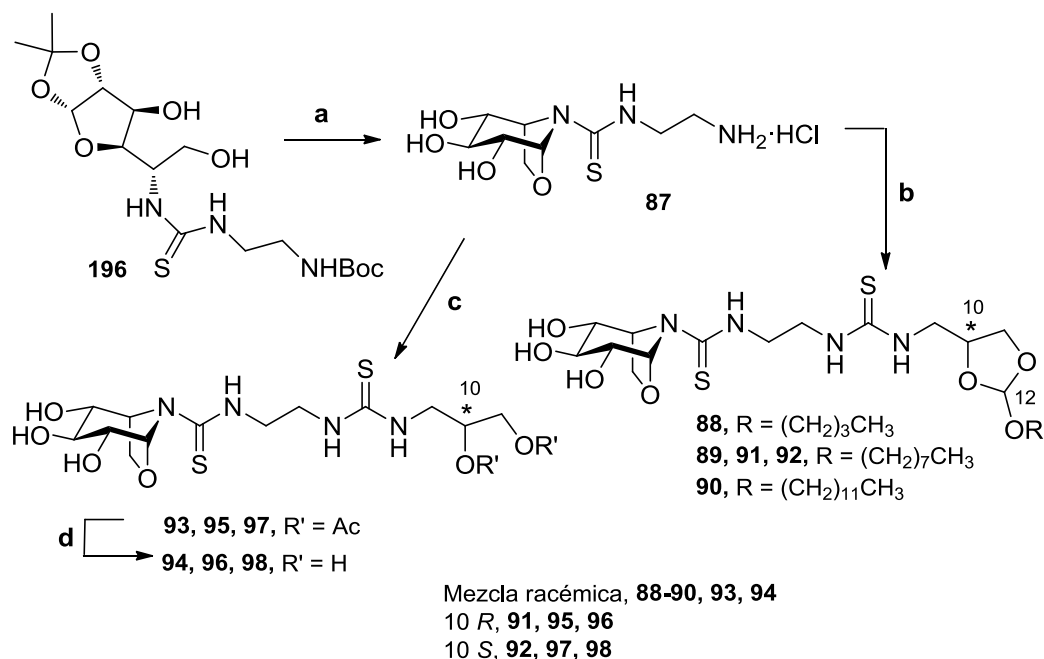


Figura 5.12. Efecto de los iminoazúcares derivados de DNJ **77-79** en la actividad de fibroblastos mutantes de GlcCasa.

5.3. Preparación de iminoazúcares sp^2 derivados de 6-oxocalistegina B_2 funcionalizados con una función ortoéster.

A la vista de los resultados previos del grupo mostrando la capacidad como PC frente a mutaciones neuronopáticas de GD de derivados de calistegina B_2 ,¹⁷ el siguiente objetivo sintético de esta Tesis consistió en la preparación de los derivados de 6-oxocalistegina B_2 provistos de un grupo ortoéster de cinco miembros sensible al pH. La preparación del sistema bicíclico de *nor*-tropano implica una transposición furanosa—piranosa seguida de glicosidación intramolecular. La ruta sintética empleada implicó la hidrólisis ácida del grupo acetal del derivado de 5-tioureido- β -L-idofuranosa²⁰ **196** empleando TFA- H_2O y la posterior glicosidación intramolecular *in situ*, que condujo al derivado de calistegina B_2 **87**, funcionalizado con un grupo amino, con un 75% de rendimiento. El acoplamiento posterior, en piridina, con los isotiocianatos racémicos **60**, **61** y **64** permitió aislar con buenos rendimientos las correspondientes tioureas derivadas de calistegina **88-90**, funcionalizadas con el grupo ortoéster. Además, se prepararon las parejas de diastereoisómeros con la cadena de octilo **91** y **92**. Por otra parte, la reacción de **87** con los isotiocianatos **74-76** seguida de desacetilación convencional con metilato

sódico dio lugar a las tioureas **94**, **96** y **98**, que serían los productos resultantes de la hidrólisis ácida (Esquema 5.6).



Esquema 5.6. Síntesis de iminoazúcares sp² sensibles a pH ácido derivados de calistegina B₂. Reactivos y condiciones: a, TFA-H₂O 9:1, 0 °C a t.a., 1 h, 75%; b, RNCS, py, Et₃N, t.a., 18 h, 52-89%; c, RNCS, py, Et₃N, t.a., 18 h, 64-75%; d, MeONa 1 M, MeOH, t.a., 1 h, cuant.

Los espectros de ¹H RMN de los iminoazúcares derivados de calistegina B₂ preparados **88-90** y **94**, **96** y **98** muestran constantes de acoplamiento vecinales características de una disposición *trans*-diaxial para los protones H-2, H-3, y H-4, con los protones cabeza de puente H-1 y H-5 en disposición ecuatorial. Esta situación es acorde con una conformación de silla para el anillo de seis miembros del esqueleto bicíclico. En los espectros de ¹³C RMN, el desplazamiento a campo bajo de la señal de C-6 confirmó su implicación en el cierre del anillo de oxazolidina (Figuras 5.13 y 5.14).

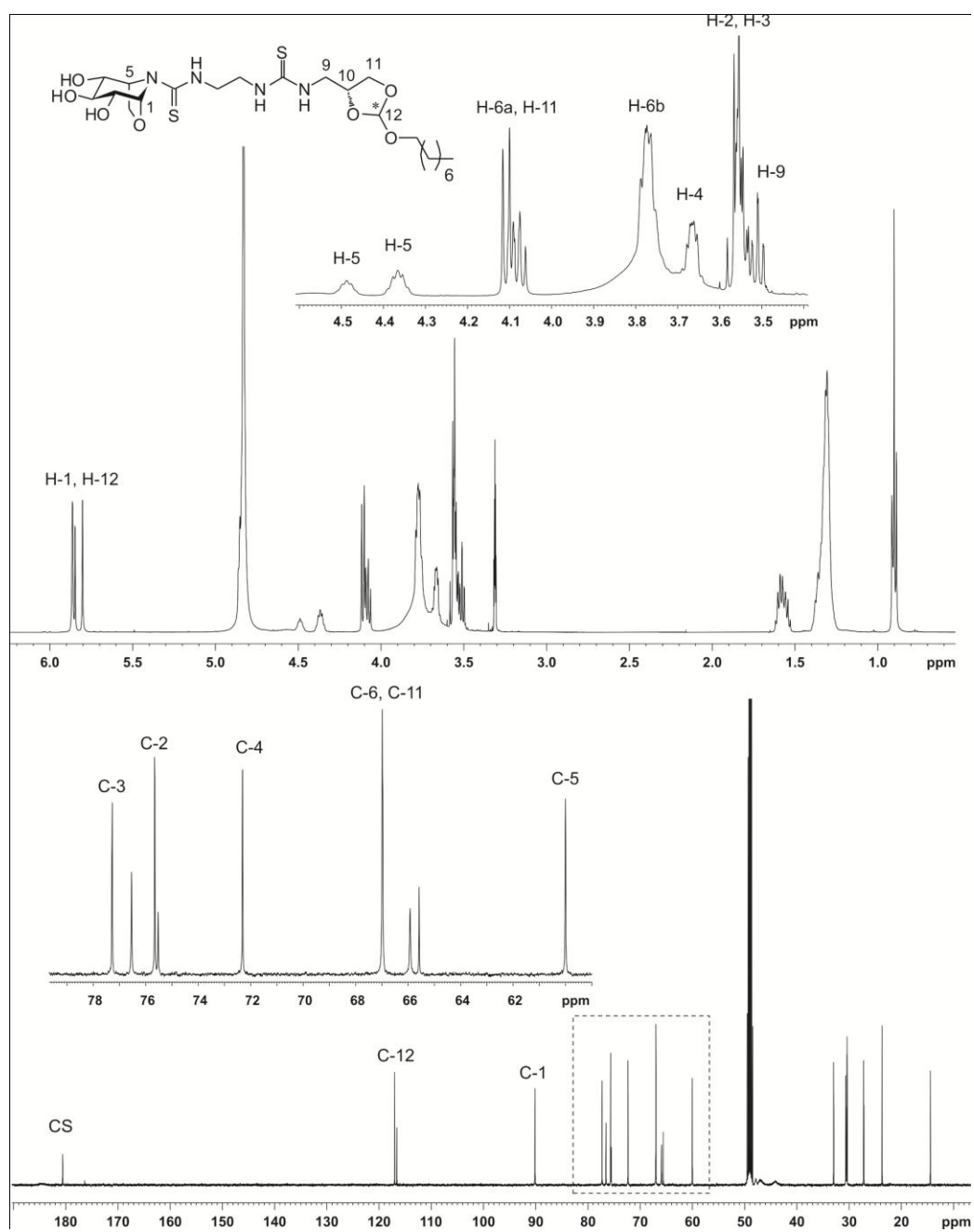


Figura 5.13. Espectros de ^1H y ^{13}C RMN (500 MHz, 125.7 MHz, CD_3OD) de **91**.

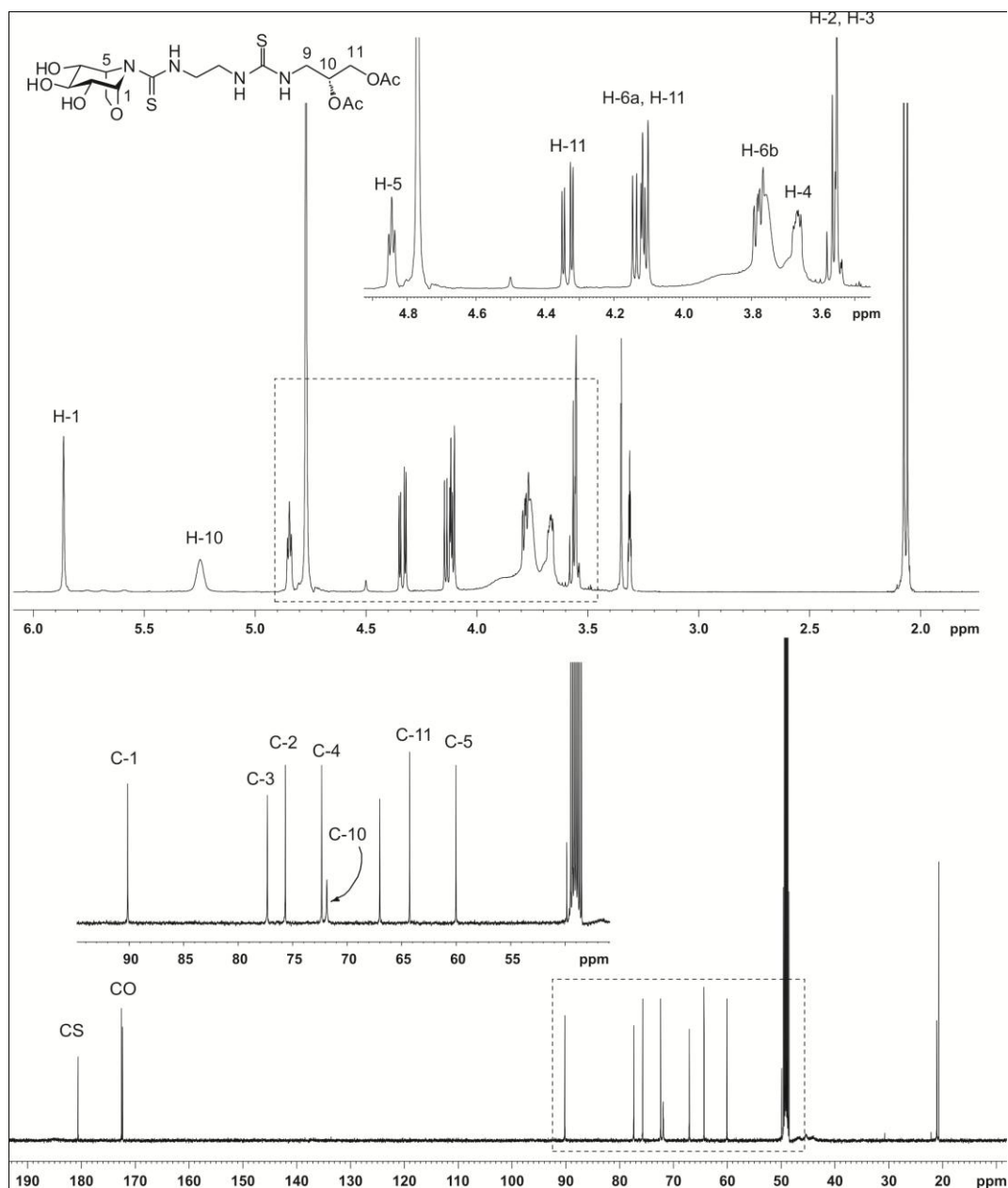


Figura 5.14. Espectros de ^1H y ^{13}C RMN (500 MHz, 125.7 MHz, CD_3OD) de **97**.

La actividad inhibitoria de los derivados de oxacalístegina B₂ se recoge en la Tabla 5.3. Ninguno de los derivados mostró inhibición frente a α -Glcasas de acuerdo con la especificidad mostrada por las calísteginas naturales. Tampoco presentaron actividad frente a α - y β -Galasas y Manasas. Es interesante destacar su capacidad para discriminar β -Glcasas de origen diferente, mostrando valores de K_i en el rango micromolar bajo o submicromolar para la enzima de origen animal mientras que frente a la β -Glcasa de almendra mostraron escasa o ninguna afinidad. Una diferencia de un orden de magnitud para los diastereoisómeros **91** (K_i 0.54 μ M) y **92** (K_i 0.62 μ M) respecto al derivado racémico **88** (K_i 3.2 μ M) puso de manifiesto la influencia de la configuración del carbono de la función ortoéster (C-12 en el Esquema 6.6) en la actividad inhibitoria frente a la enzima.

Tabla 5.3. Comparación de la actividad como inhibidores de glicosidasas (K_i , μ M) para los derivados de 6-oxacalístegina B₂.^a

ENZIMAS	88	89	90	91	92	96	98	94
β-Glcasa								
Hígado de buey	3.2	0.58	1.2	0.54	0.62	65	67	27
Almendra pH 7.3	306	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.

n. i. No se detectó inhibición. ^aNinguno de los compuestos mostró inhibición frente a la enzima α -Glcasa (levadura), isomaltasa (levadura), amiloglicosidasa (*Asp. Níger*), naringinasa (*Penicilium decumbens*), α -Galasa (grano verde de café), β -Galasa (*E. Coli*), α -Manasa (judía Jack) y β -Manasa (*Helix pomatia*).

5.4. Estudios de degradación de inhibidores sensibles a pH ácido mediante HPLC.

Para evaluar la estabilidad y determinar la cinética de hidrólisis de los iminoazúcares funcionalizados con el grupo ortoéster, se ha utilizado la cromatografía HPLC con detector de UV, empleando una columna de fase reversa C18 y un gradiente de H₂O-MeCN.

En la Figura 5.15 A se muestran los cromatogramas correspondientes a varias alícuotas de **77** tras incubación en tampón citrato-fosfato (pH 5.5) a 37 °C tomadas a diferentes intervalos de tiempo, observándose la desaparición progresiva del pico correspondiente a **77** (t_R 7.974 min) y la aparición del producto de hidrólisis **81** (t_R 2.108 min). Los resultados permiten confirmar la hidrólisis completa al cabo de 90 min, un tiempo relativamente corto, lo que confirma el potencial del grupo ortoéster como interruptor sensible al pH lisosomal para incrementar la actividad como PCs de los iminoazúcares sp^2 (Figura 5.15 B).

También se ha determinado la velocidad de la hidrólisis para los derivados de calistegina **88** y **89** mediante la integración relativa de los picos correspondientes al iminoazúcar de partida y al producto de hidrólisis. En el caso de **88** se obtuvieron los valores de las constantes de velocidad para dos concentraciones diferentes del iminoazúcar, encontrándose que la velocidad de hidrólisis es independiente de la misma, como cabe esperar para una reacción de orden 0 (Figuras 5.17 y 5.18). La comparación de las constantes de hidrólisis tampoco mostró variaciones significativas al incrementar la longitud del espaciador, como se desprende de la comparación de los datos para **88** y **89** (Figuras 5.16 y 5.19).

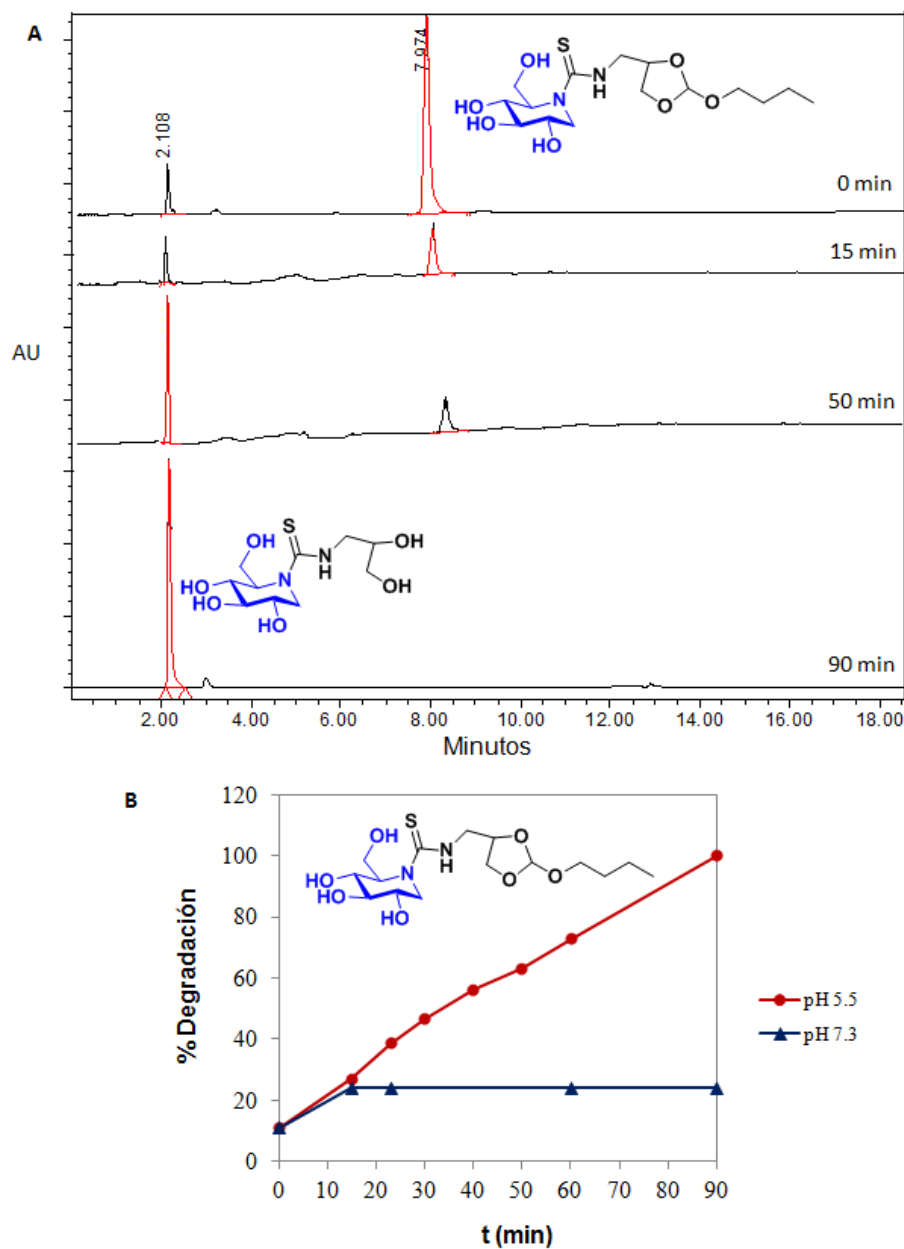


Figura 5.15. (A) Comparación de los cromatogramas de HPLC (columna C18, gradiente H₂O-MeCN) mostrando las proporciones relativas de **77** y del producto de hidrólisis **81** en función del tiempo a pH 5.5. (B) Perfil de hidrólisis del derivado **77** a pH 7.3 y 5.5.

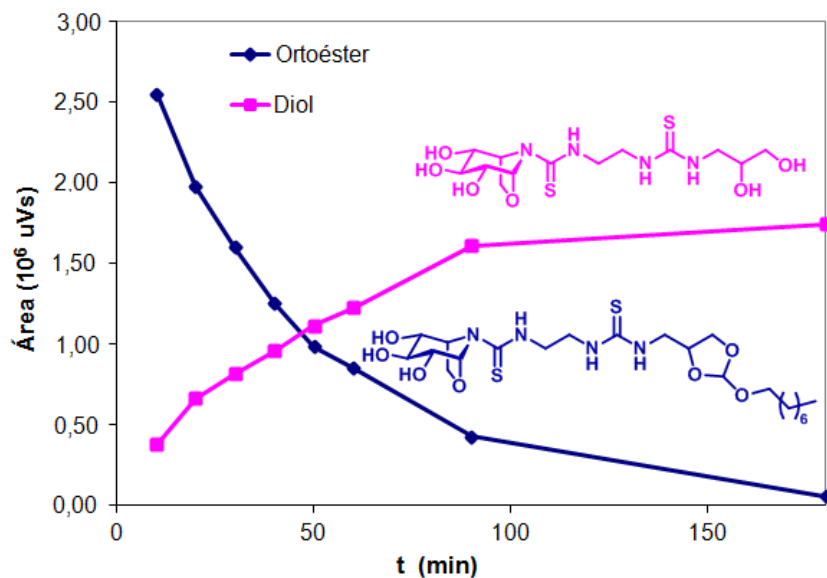


Figura 5.16. Variación de las proporciones relativas de **88** y **94** durante la hidrólisis del grupo ortoéster a pH 5.5.

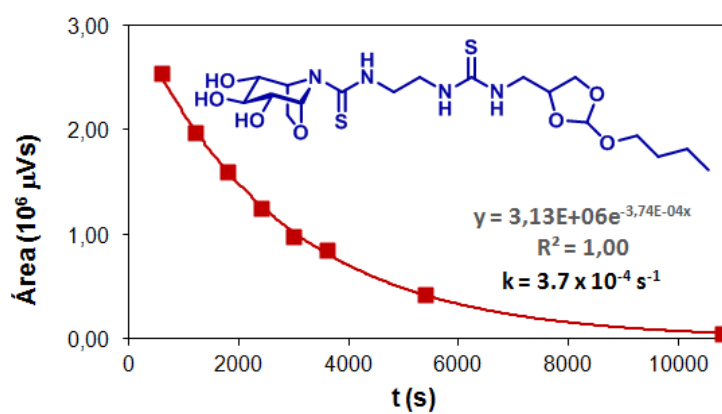


Figura 5.17. Velocidad de hidrólisis del derivado **88** (130 μM) a pH 5.0 y 37 °C.

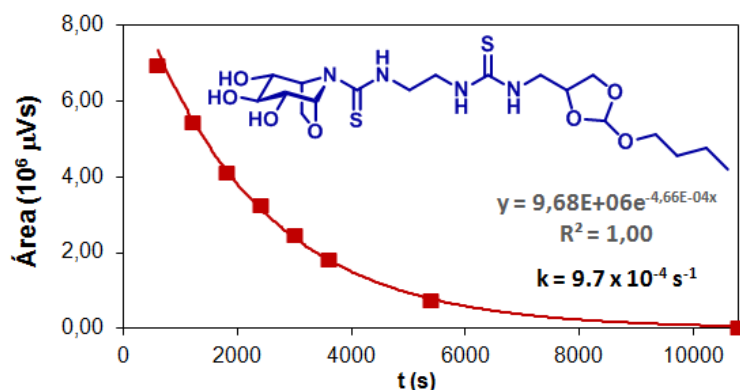


Figura 5.18. Velocidad de hidrólisis del derivado **88** (1 mM) a pH 5.0 y 37 °C.

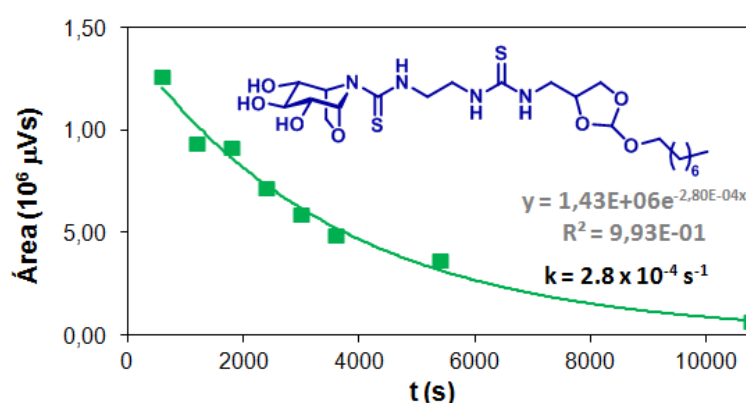


Figura 5.19. Velocidad de hidrólisis del derivado **89** (80 μM) a pH 5.0 y 37 °C.

En este capítulo se ha detallado el diseño y síntesis de una novedosa familia de iminoazúcares equipados con un grupo ortoéster que se comporta como interruptor sensible al pH, permaneciendo estable a pH 7 y provocando la separación de la cadena hidrófoba del núcleo bicíclico polihidroxilado en las condiciones ácidas (pH 5.0-5.5) que se encontraría en el interior del lisosoma. La afinidad y elevada especificidad que han mostrado algunos de los derivados preparados por la GlcCasa a pH 7.3, entorno típico del RE, es significativamente mayor que la determinada para el correspondiente producto de hidrólisis y potenciaría la actividad como PCs de estos compuestos. Los ensayos preliminares sobre fibroblastos humanos de pacientes de Gaucher con los derivados de

DNJ ponen de manifiesto la validez de la aproximación, observándose un incremento de la actividad residual de la GlcCasa incluso en el caso de la mutación L444P.

-
- ¹ M. Robinson, *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2004**, *20*, 30-37.
- ² A. A. Kale, V. P. Torchilin, *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 363-370.
- ³ J. Remenyi, B. Balazs, S. Toth, A. Falus, G. Toth, F. Hudecz, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *303*, 556-561.
- ⁴ J. Shin, P. Shum, D. H. Thompson, *J. Control. Release* **2003**, *91*, 187-200.
- ⁵ E. R. Gillies, A. P. Goodwin, J. M. Frechet, *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 1254-1263.
- ⁶ H. Bruyère, A. D. Westwell, A. T. Jones, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 2200-2203.
- ⁷ S. Binauld, M. H. Stenzel, *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 2082-2102.
- ⁸ I. F. Tannock, D. Rotin, *Cancer Res.* **1989**, *49*, 4373-4384.
- ⁹ a) S. Dai, P. Ravi, K. C. Tam, *Soft Matter* **2008**, *4*, 435-449; b) D. Schmaljohann, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2006**, *58*, 1655-1670.
- ¹⁰ I. Mellman, R. Fuchs, A. Helenius, *Annu. Rev. Biochem.* **1986**, *55*, 773-700.
- ¹¹ L. E. Gerweck, *Semin. Rad. Oncol.* **1998**, *8*, 176-182.
- ¹² Inflammation-basic principles and clin. correlates (Eds.: J. I. Gallin, I. M. Goldstein, R. Snyderman), Raven Press, New York, **1992**.
- ¹³ C. Masson, M. Garinot, N. Mignet, B. Wetzler, P. Mailhe, D. Scherman, J. M. Bessodes, *J. Control. Release* **2004**, *99*, 423-434.
- ¹⁴ X. Guo, F.C. Szoka Jr., *Bioconjug. Chem.* **2011**, *12*, 291- 300.
- ¹⁵ Iminosugars: From Synthesis to Therapeutic Applications (Eds.: P. Compain, O. R. Martin), Wiley, New York, **2007**.
- ¹⁶ a) Z. Luan, K. Higaki, M. Aguilar-Moncayo, H. Ninomiya, K. Ohno, M. I. García-Moreno, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, Y. Suzuki, *ChemBioChem* **2009**, *10*,

2780-2792; b) M. Aguilar-Moncayo, T. Takai, K. Higaki, T. Mena-Barragán, Y. Hirano, K. Yura, L. Li, Y. Yu, H. Ninomiya, M. I. García-Moreno, S. Ishii, Y. Sakakibara, K. Ohno, E. Nanba, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, Y. Suzuki, *Chem. Commun.* **2012**, 48, 6514-6516.

¹⁷ P. Alfonso, V. Andreu, A. Pino-Angeles, A. A. Moya-García, M. I. García-Moreno, J. C. Rodríguez-Rey, F. Sánchez-Jiménez, M. Pocoví, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, P. Giraldo, *ChemBioChem* **2013**, 14, 943-949.

¹⁸ H. Munch, J. S. Hansen, M. Pittelkow, J. B. Christensen, U. Boas, *Tet. Letters* **2008**, 49, 3117-3119.

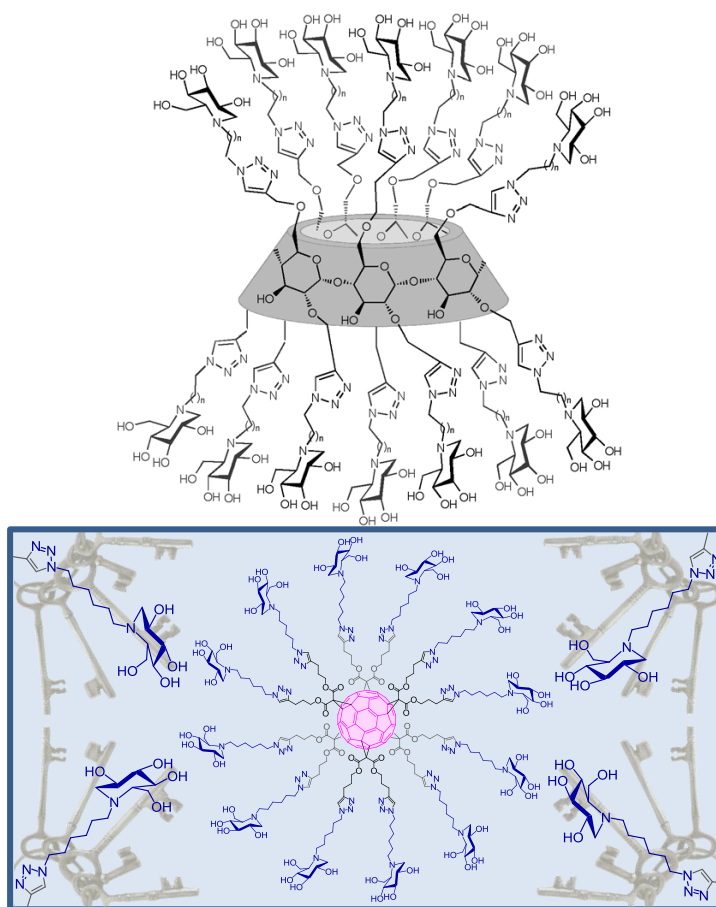
¹⁹ G. H. B. Maegawa, M. B. Tropak, J. D. Buttner, B. A. Rigat, M. Fuller, D. Pandit, L. Tang, G. J. Kornhaber, Y. Hamuro, J. T. Clarke, D. J. Mahuran, *J. Biol. Chem.* **2009**, 284, 23502-23516.

²⁰ M. Aguilar, P. Díaz-Pérez, M. I. García-Moreno, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 1995-1998.

Capítulo 6

El efecto Inhibidor Multivalente

Abstract: Fullerene-based and cyclodextrin-based iminosugar clusters show a binding enhancement of up to 3–4 orders of magnitude over the corresponding monovalent ligand in glycosidase inhibition assays. This is the strongest multivalent effect ever observed for glycosidase inhibition.



6. Síntesis de iminoazúcares multivalentes basados en el fullereno C₆₀ y en la β-ciclodextrina mediante química clic: efecto inhibidor multivalente.

El concepto de multivalencia ha proporcionado una estrategia poderosa para el diseño de ligandos capaces de modular la actividad de receptores macromoleculares en células, bacterias o virus.¹ Su importancia es particularmente relevante en glicobiología, donde muchos procesos de reconocimiento están mediados por las interacciones carbohidrato-lectina.² Estas proteínas son capaces de reconocer de modo muy específico a los carbohidratos complementarios. Sin embargo, la afinidad de las interacciones individuales entre un sitio de reconocimiento en la lectina y un motivo glucídico de reconocimiento es, en general, débil con constantes de asociación en el rango milimolar. En la naturaleza, para incrementar la fuerza de unión, cada molécula de lectina presenta normalmente dos o más sitios de reconocimiento, y los carbohidratos complementarios se disponen en múltiples copias. El resultado es un incremento de la afinidad mayor que el que resultaría de la simple adición de interacciones individuales, lo que se conoce como efecto cluster o efecto multivalente. Inspirados en este modelo, se han diseñado una amplia variedad de glicoligandos multivalentes sintéticos capaces de interaccionar de modo muy eficaz con las correspondientes lectinas.³

A diferencia de las lectinas, las glicosidasas presentan normalmente un único sitio de unión para los sustratos que hidrolizan y las afinidades por inhibidores competitivos que se unen a este sitio activo pueden ser muy altas, por lo que muchos de los mecanismos responsables de los incrementos de afinidad que operan en la interacción multivalente carbohidrato-lectina, como el efecto quelato o el entrecruzamiento, no serían posibles.⁴ De hecho, sólo se han descrito unos cuantos ejemplos de inhibidores enzimáticos multivalentes.⁵ Los primeros estudios descritos acerca del efecto de una presentación multivalente de ligandos de enzimas, empleando compuestos de baja valencia en DNJ, no fueron particularmente concluyentes.⁶ Si bien para algunas enzimas se observó un incremento en la afinidad, éste fue sólo ligeramente superior al esperado

para un efecto estadístico. Los mejores resultados se obtuvieron en el caso del derivado trivalente de DNJ (**DNJ**)₃ (Figura 1.11). El efecto sobre la actividad inhibitoria en comparación con el ligando monomérico fue dependiente de la enzima, observándose un incremento de seis veces de su capacidad inhibitoria frente a la α -Manasa de judía Jack respecto a la DNJ.⁷ Esta enzima es una manosidasa de tipo II- α y pertenece a la misma familia (GH38) que la α -Manasa lisosomal humana y la α -Manasa de Golgi, enzimas de gran relevancia biológica, con las que comparten rasgos estructurales, por lo que puede considerarse un modelo de las mismas. La inhibición de la primera por el alcaloide swainsonina (Figura 6.1) ha demostrado reducir la metástasis celular y el crecimiento de tumores⁸ y deficiencias en el funcionamiento de la segunda están relacionadas con la α -manosidosis, una enfermedad perteneciente al grupo de las LSDs.

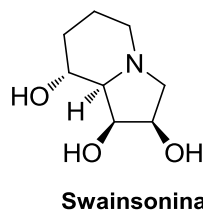


Figura 6.1. Estructura de la swansonina.

Asumiendo que los procesos de asociación y disociación enzima-inhibidor son suficientemente rápidos, cabría esperar que una concentración local más elevada del ligando en la zona próxima al sitio activo, resultante de su presentación multivalente, favoreciera un mecanismo de captura por la glicosidasa, promoviendo un aumento de la afinidad. Con objeto de confirmar si efectivamente la multivalencia puede constituir una nueva herramienta en el diseño de inhibidores de glicosidasas, nos planteamos estudiar el efecto de la presentación multivalente de los motivos de iminoazúcar sobre diferentes plataformas en el perfil de selectividad y en la afinidad por diferentes glicosidasas de un determinado iminoazúcar. Estos trabajos se han llevado a cabo en colaboración con los

Prof. P. Compain y J. F. Nierengarten de la Universidad de Estrasburgo, utilizando el fullereno-[C₆₀] o la βCD como plataformas multitópicas.

6.1. Descubrimiento de fullerenos.

Hasta hace 25 años, sólo dos alótropos del carbono, el diamante (sólido transparente con estructura cristalina cúbica y de gran rigidez) y el grafito (mineral de color gris con estructura de láminas apiladas y gran tendencia al deslizamiento) eran conocidos por la comunidad científica. La variedad de formas alotrópicas se amplió en la década de los 80 tras el descubrimiento, en orden cronológico, de los fullerenos (estructuras huecas y cerradas constituidas por un número definido de átomos de carbono en los vértices y con elevada simetría),⁹ los nanotubos de carbono (estructuras constituidas por átomos de carbono con forma cilíndrica)¹⁰ y el grafeno (láminas bidimensionales de átomos de carbono)¹¹ (Figura 6.2). Los fullerenos fueron descubiertos de forma casual por Robert F. Curl, Sir Harold W. Kroto y Richard E. Smalley en 1985⁹ y once años después, en 1996, los tres científicos recibieron el Premio Nobel de Química por dicho hallazgo. Este descubrimiento supuso un gran avance en los campos de la Física y la Química a finales del siglo XX y abrió una nueva línea de investigación en el terreno de la biomedicina y la nanotecnología, generando una revolución científica pocas veces observada.

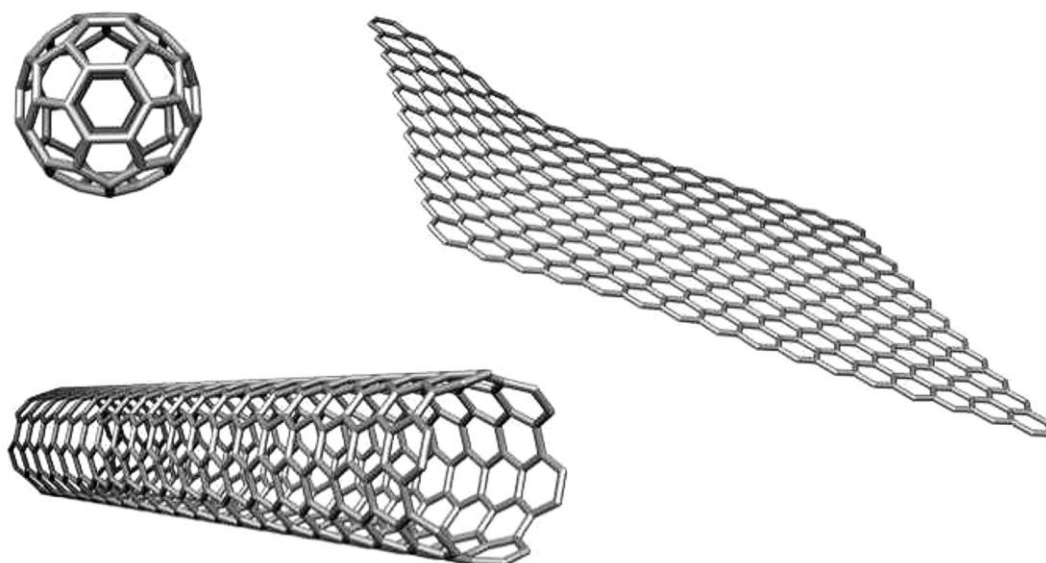


Figura 6.2. Estructura química del fullereno C₆₀, nanotubo de carbono y grafeno.

Los fullerenos varían respecto al número de átomos de carbono que poseen. El más pequeño conocido hasta ahora es C₂₀ y se descubrió en el año 2000.¹² La mayoría de los fullerenos contienen 12 pentágonos y la disposición de éstos en la estructura es lo que determina la estabilidad de los diferentes isómeros. La presencia de dos pentágonos adyacentes en la superficie del fullereno lleva a una desestabilización de éstos, por ello, los isómeros más estables de un fullereno no contienen pentágonos adyacentes. Los fullerenos más comunes son C₆₀ y C₇₀ y son los que han recibido más atención en los últimos años. Destaca sobre todos el fullereno C₆₀, formado por 12 pentágonos y 20 hexágonos, cuya estabilidad está gobernada por la “regla de los pentágonos aislados”, la cual establece que para un número de átomos de carbono, el fullereno más estable es el que no contiene pentágonos adyacentes, siendo además la responsable de la geometría cóncava del fullereno. El fullereno más pequeño que cumple la “regla de los pentágonos aislados” es el fullereno C₆₀. Debido a dicha geometría, el fullereno C₆₀ también recibe el nombre de “buckminsterfullereno” en honor al arquitecto estadounidense R.

Buckminster Fuller, quien popularizó las llamadas cúpulas geodésicas caracterizadas por tener forma esférica (Figura 6.3).

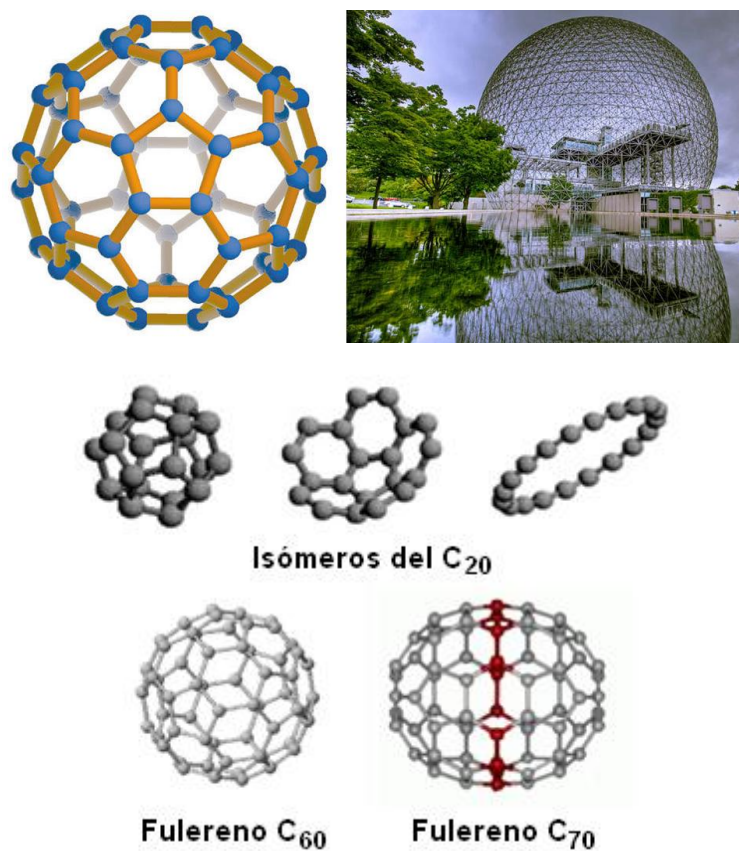


Figura 6.3. Estructura del fullereno C₆₀ y de las cúpulas geodésicas y representación de fullerenos de diferente peso molecular.

La elevada simetría del fullereno C₆₀, de tipo icosaedro truncado, genera un espectro de ¹³C RMN con una señal única a δ 143 ppm. La nomenclatura, de acuerdo con la IUPAC, hace referencia tanto a la simetría como al tipo de ciclos que lo forman “(C₆₀-I_h) [5,6] fullereno”. Debido a la falta de planaridad de la estructura, la aromaticidad del C₆₀ no está clara, ya que no existe una conjugación completa del sistema π . En

consecuencia, se observan dos tipos de enlaces no equivalentes. Los enlaces que son aristas comunes entre pentágonos y hexágonos, que tienen carácter de enlace simple ($[5,6] = 1,45\text{\AA}$), y los enlaces que separan dos hexágonos, que tienen carácter de doble enlace ($[6,6] = 1,38\text{\AA}$). En general, podemos encontrar hasta siete tipos de enlace diferentes: tres de tipo $[6,6]$, tres de tipo $[5,6]$ y uno de tipo $[5,5]$ en aquellos fullerenos que no cumple la “regla de los pentágonos aislados”. Los enlaces presentes en la molécula de C_{60} son de tipos A y F (Figura 6.4).¹³

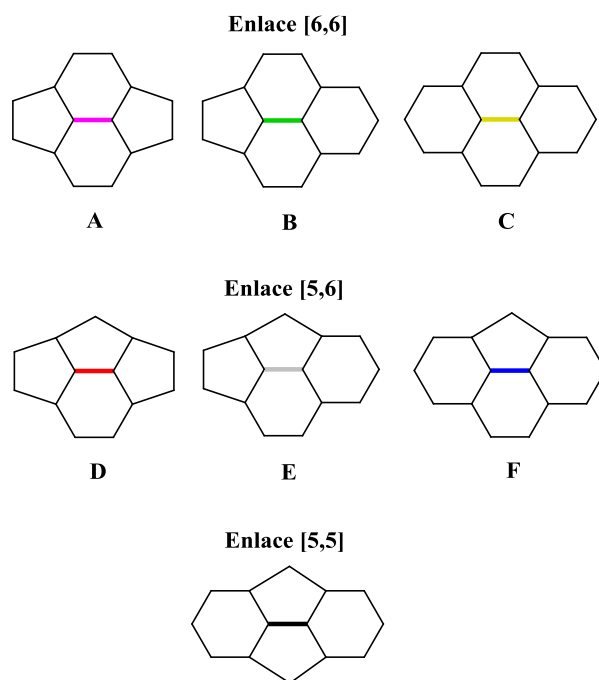


Figura 6.4. Tipos de enlaces diferentes en los fullerenos.

Su reactividad¹⁴ es análoga a la de un polieno deficiente en electrones, de ahí que las reacciones en las que participa sean adiciones nucleofílicas y cicloadiciones¹⁵, comportándose los enlaces $[6,6]$ como buenos dienófilos (Figura 6.5).

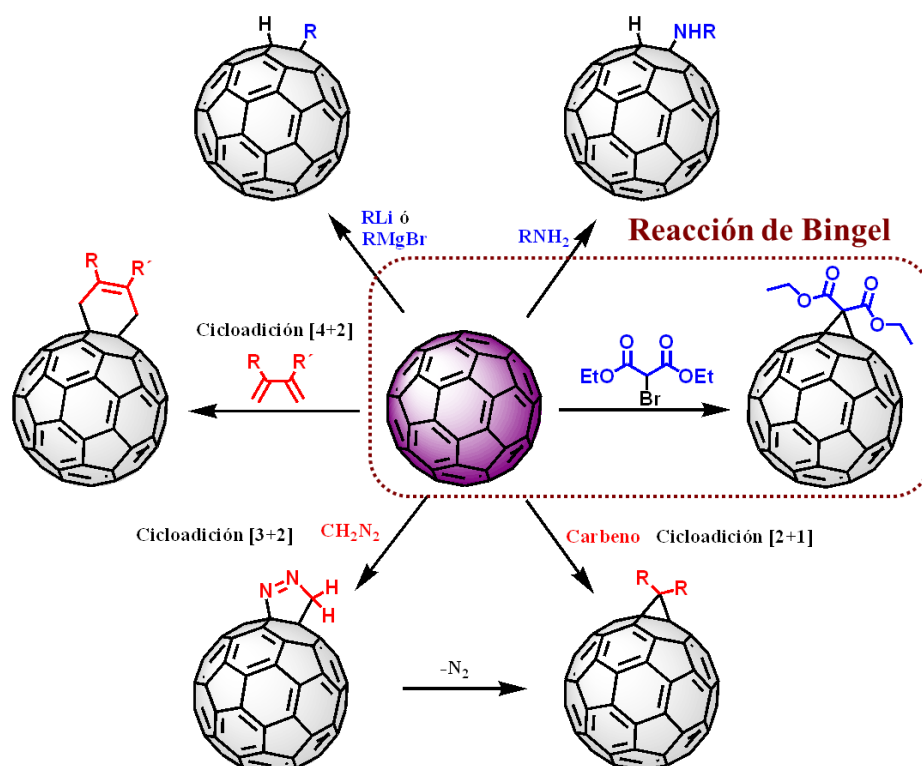


Figura 6.5. Reactividad del C_{60} frente a la adición de nucleófilos y a las cicloadiciones. Se ha destacado la reacción empleada en el desarrollo de este capítulo de Tesis (la ciclopropanación de Bingel).

Una de las reacciones más estudiadas de la química del fullereno C_{60} es la reacción de ciclopropanación descrita por Bingel que transcurre con rendimientos elevados y bajo condiciones relativamente suaves.¹⁶ Se trata de un proceso de adición-eliminación que comienza con la adición nucleofílica de un halocarbanión, generado *in situ*, y posterior desplazamiento intramolecular del haluro promovida por el centro aniónico generado en el núcleo de C_{60} (Figura 6.6).

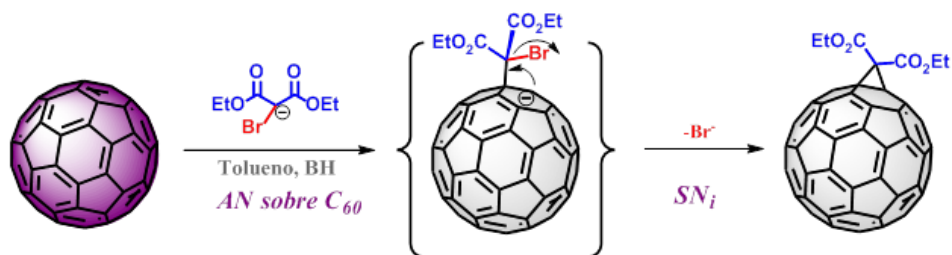


Figura 6.6. Mecanismo de la reacción de ciclopropanación de Bingel.

La aplicación de este procedimiento sucesivas veces en la plataforma de C_{60} origina un hexaaducto simétrico (simetría T_h), con una elevada estabilidad termodinámica.¹⁷ En estos aductos, los carbonos sustituidos han aumentado su piramidalización al cambiar su hibridación de sp^2 a sp^3 . Además, los ocho ciclos de seis miembros no sustituidos (localizados cada uno en una cara del tetraedro) ganan planaridad y pasan a ser de tipo bencénico, con hibridación sp^2 , lo que confiere a la arquitectura general una estabilidad adicional (Figura 6.7).

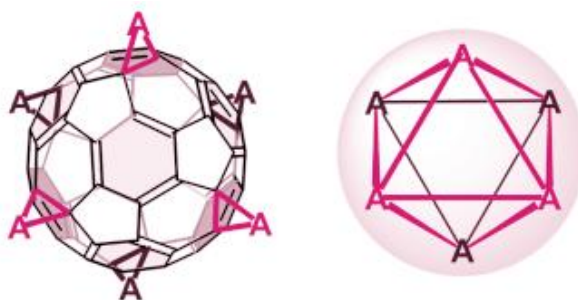


Figura 6.7. Representación de un hexaaducto de fullereno C_{60} con indicación de su simetría tetraédrica.¹⁷

En este capítulo se describe la preparación de derivados del iminoazúcar DNJ basados en un hexaaducto descrito previamente por el Prof. Nierengarten¹⁸ y que está funcionalizado con 12 grupos alquinos terminales (**197**, Esquema 6.2). Su preparación, basada en trabajos de Sun *et al.*,¹⁹ implica la reacción de C_{60} con un derivado del ácido malónico en presencia de un gran exceso de tetrabromuro de carbono (100 eq.) y de una

base no nucleófila como DBU (1,8-diazabicyclo undec-7-eno, 20 eq.), que genera el bromocarbanión CBr_3^- in situ (Figura 6.8).

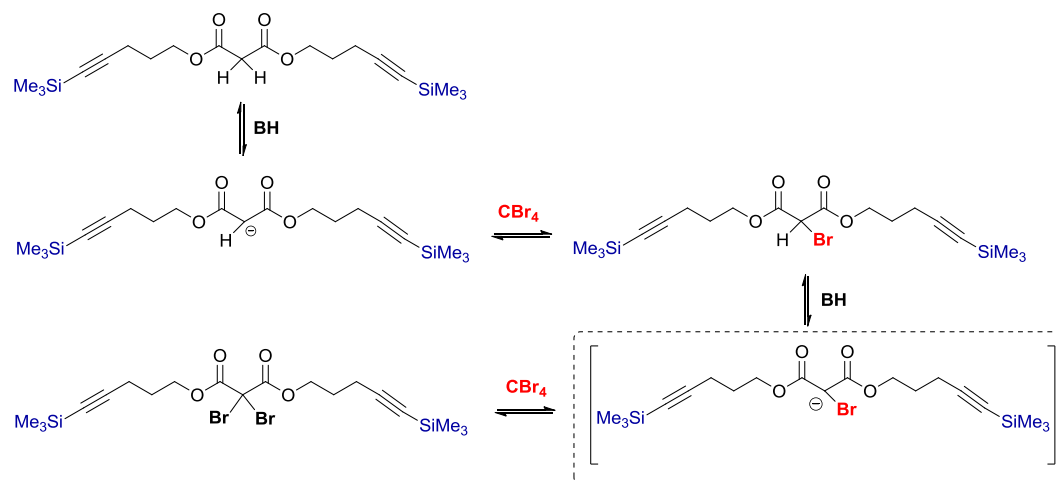


Figura 6.8. Formación del bromocarbanión para la persustitución del C_{60} con grupos alquinos.

El hexaaducto **197** constituye una plataforma muy útil para la preparación de conjugados multifuncionalizados empleando la química clic. La incorporación de monosacáridos como la β -D-glucopiranos²⁰ (Figura 6.9, **198**) con buenos rendimientos ha permitido poner a punto una nueva estrategia para la disposición multivalente de motivos glucídicos. Otro ejemplo lo constituye la preparación de una serie de conjugados dodecavalentes que incorporan motivos de heptósidos y octósidos²¹ (un ejemplo se representa en la Figura 6.9, **199**) que se comportan como inhibidores potentes de una heptosiltransferasa bacteriana de membrana, fundamental en procesos de adhesión y reconocimiento celular. También se ha descrito recientemente la preparación de conjugados dodecatrizólicos con motivos dendríticos²² (Figura 6.9, **200**) que permiten incorporar hasta 96 grupos amino. Estos conjugados son eficaces para la compactación del ADN mediante la formación de complejos estables, comportándose como buenos agentes de transfección. En esta Tesis, hemos explotado la versatilidad de esta plataforma

para la preparación de conjugados dodecavalentes que incorporan motivos de DNJ para el estudio del efecto inhibitor multivalente.

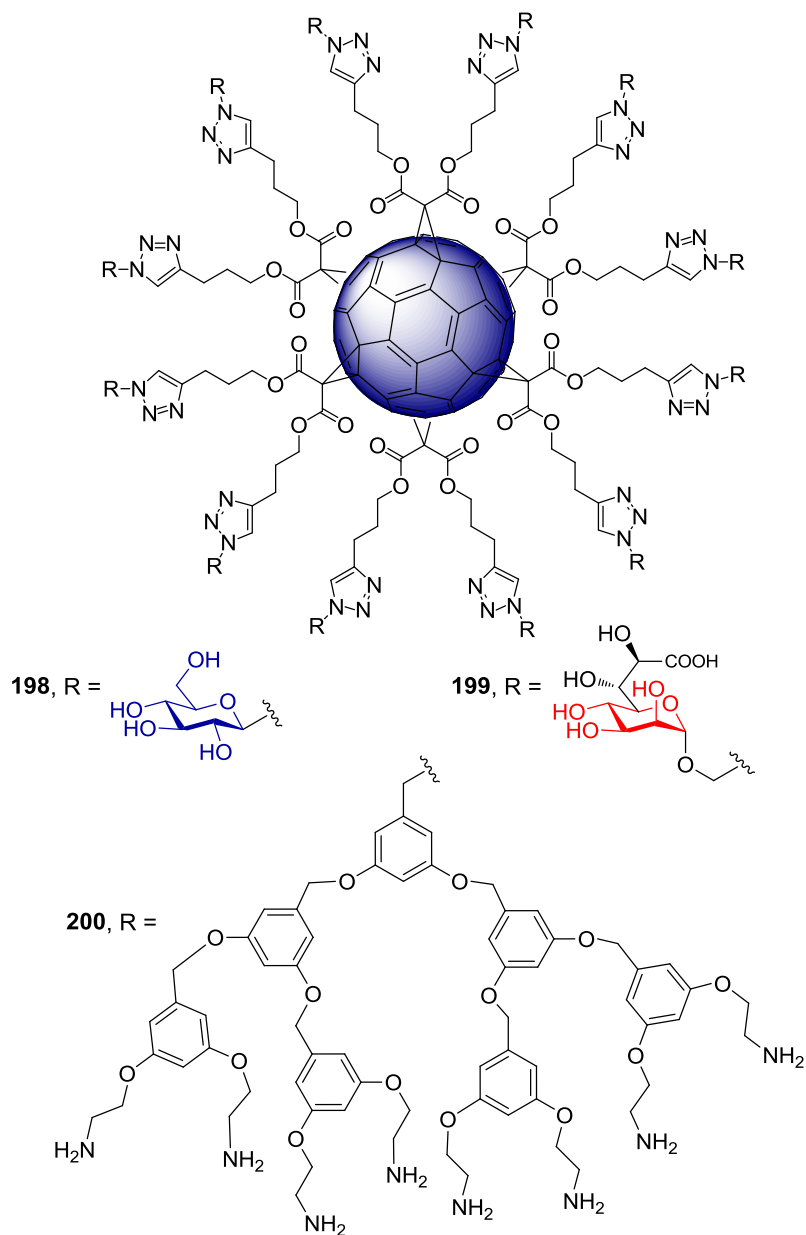
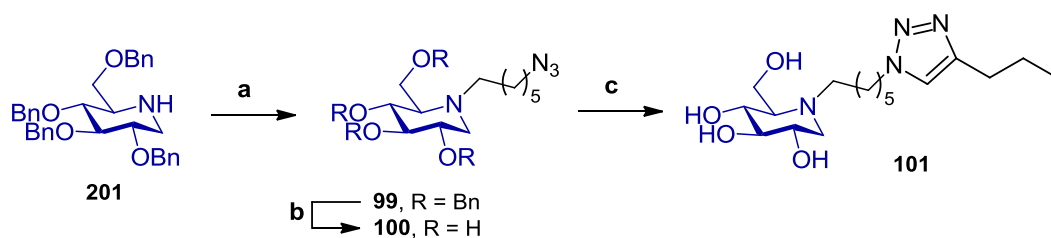


Figura 6.9. Ejemplos de estructuras dodecavalentes basadas en hexaaductos de fullereno.

6.2. Síntesis y evaluación de iminoazúcares multivalentes basados en fullereno [C₆₀].

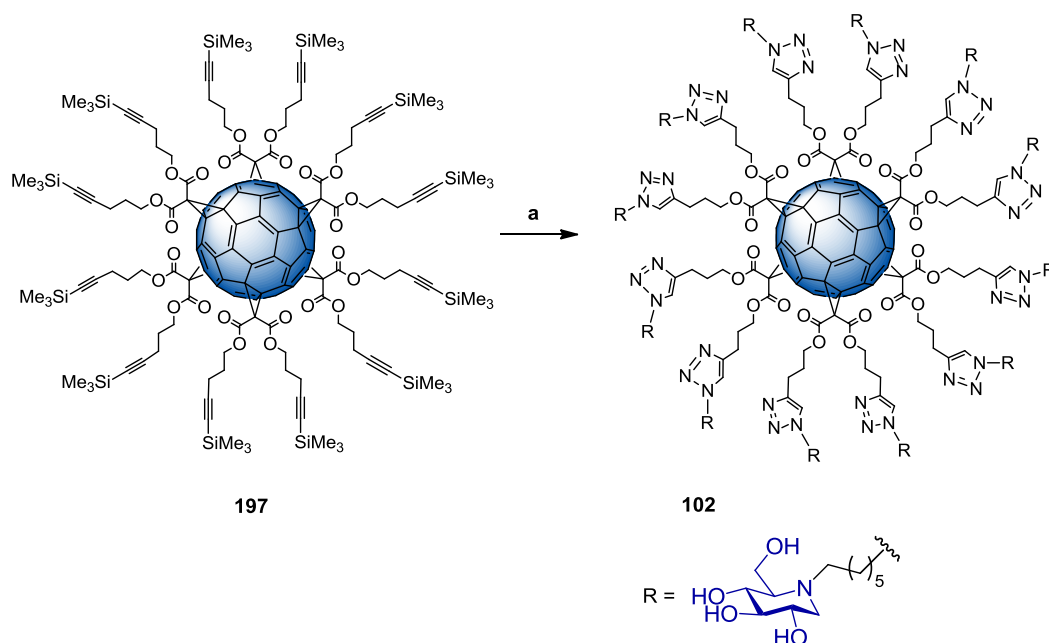
Una característica interesante del hexaaducto de fullereno C₆₀ para el estudio de interacciones multivalentes es que, al ser isotrópico, los resultados no están condicionados por la orientación de los motivos de reconocimiento. En primer lugar, se abordó la preparación del aducto monovalente **101**, que se utilizará como referencia en los ensayos de inhibición enzimática, siguiendo la ruta sintética que se detalla en el Esquema 6.1. La *N*-alquilación del derivado perbencilado de DNJ **201**, preparado mediante la optimización de una estrategia descrita previamente por Overkleeft y Vasella,²³ con 1-azido-6-bromohexano en DMF a 120 °C dio lugar al derivado per-*O*-bencilado **99** con un 51% de rendimiento. La desprotección selectiva de los grupos bencilos, sin que se afectara el grupo azida, se llevó a cabo con un 77% de rendimiento por tratamiento con BCl₃ en CH₂Cl₂ a baja temperatura.²⁴ Finalmente, el acoplamiento de tipo CuAAC²⁵ del azido derivado **100** con 1-pentino en presencia de CuSO₄·5H₂O y ascorbato sódico dio lugar al derivado triazólico de DNJ **101** con un 61% de rendimiento.



Esquema 6.1. Síntesis del conjugado monovalente derivado de DNJ **101**. Reactivos y condiciones: a, Br(CH₂)₆N₃, Et₃N, DMAP, DMF, 120 °C, 38% (51% basado en la recuperación del producto de partida); b, BCl₃, CH₂Cl₂, -60 °C a 0 °C, 77%; c, 1-pentino, ascorbato sódico, CuSO₄·5H₂O, DMF-H₂O 1:1, 61%.

Para la preparación del derivado dodecavalente de DNJ basado en fullereno-[C₆₀] se utilizó la reacción de acoplamiento múltiple de tipo clic CuAAC entre el hexaaducto de fullereno funcionalizado con grupos alquino **197**¹⁸ y la DNJ *N*-alquilada con una cadena alifática de seis átomos de carbono y un grupo azida terminal **100**. El tratamiento

de **197** con fluoruro de tetrabutilamonio (TBAF) genera los grupos terminales alquino por desililación, que pueden ahora reaccionar con **100** *in situ* en una mezcla DMF-H₂O, proporcionando el derivado **102** con un rendimiento del 83% (Esquema 6.2). La homogeneidad del aducto dodecavalente **102** se confirmó mediante experimentos de ¹H y ¹³C RMN (Figura 6.10), que mostraron un único juego de señales para las 12 unidades del motivo de iminoazúcar así como las señales correspondientes al núcleo [C₆₀], sin que se detectaran señales de alquino. La presencia de los anillos de triazol se demostró por la asignación de la señal correspondiente al protón aromático (7.81 ppm) así como las de los correspondientes carbonos (145.5 y 121.7 ppm).



Esquema 6.2. Síntesis del conjugado dodecavalente DNJ-[C₆₀] **102**. Reactivos y condiciones: a, **100**, TBAF, ascorbato sódico, CuSO₄·5H₂O, DMF-H₂O 1:1, 83%.

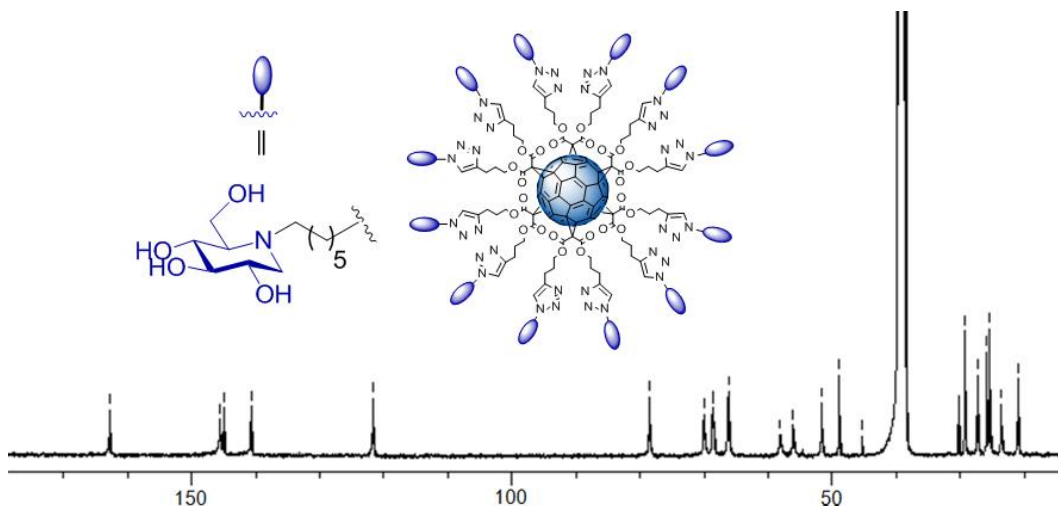


Figura 6.10. Espectro ^{13}C RMN (100.6 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) de **102**.

La evaluación de la actividad como inhibidor de glicosidasas del derivado dodecavalente de fullereno-DNJ **102** así como del modelo monovalente **101** frente a un panel de glicosidasas comerciales indicó un modo de inhibición reversible y competitivo en todos los casos (Figura 6.11). Los correspondientes valores de K_i se recogen en la Tabla 6.1. La influencia de la presentación multivalente del iminoazúcar resultó ser fuertemente dependiente de la naturaleza de la enzima. Únicamente en el caso de la β -*Glcasa* de almendra se observó una disminución significativa (9 veces) de la potencia de inhibición respecto al conjugado monovalente. Para la amiloglucosidasa y la β -*Glcasa* de hígado de buey, la potencia de inhibición no se afectó por la presentación multivalente del motivo de DNJ, con valores de K_i en el rango submicromolar o micromolar, respectivamente, tanto para **101** como para **102**. Para la mayoría de las glicosidasas se observó un incremento de la potencia de inhibición que llega hasta 2150 veces en el caso de la α -*Manasa* de judía Jack. El derivado multivalente se comportó como un inhibidor en el rango micromolar de α -*Galasa* (grano verde de café), mientras que el derivado monovalente fue completamente inactivo. La potencia de inhibición aumentó 90 veces (7.5 veces por unidad de DNJ) en el caso de la isomaltasa (levadura).

Tabla 6.1. Comparación de la actividad como inhibidores de glicosidasas (K_i , μM) para los derivados de DNJ mono y multivalente basado en fullereno $[\text{C}_{60}]$.^a

ENZIMAS	Iminoazúcar monovalente 101	Iminoazúcar multivalente 102	Potencia relativa ^b 101/102
α-Glucasa			
Levadura	152	18	8.7 (0.7)
Isomaltasa	943	10	90 (7.5)
Amiloglucosidasa	0.71	0.69	1.0 (0.08)
β-Glucasa			
Hígado de buey	482	247	1.9 (0.16)
Almendra	11	95	0.1 (0.01)
Naringinasa	9.1	0.41	22 (1.8)
α-Galasa			
Grano verde de café	n.i.	84	> 23 (> 1.9)
β-Galasa			
Hígado de buey	262	34	7.7 (0.6)
α-Manasa			
Judía Jack	322	0.15	2147 (179)

n. i. No se detectó inhibición. ^aNinguno de los compuestos mostró inhibición frente a la enzima β -Galasa (*E. Coli*) y β -Manasa (*Helix pomatia*). ^bEl valor indicado entre paréntesis corresponde a la potencia relativa de inhibición por unidades de DNJ.

El resultado obtenido para la α -Manasa (judía Jack), frente a la cual el modelo monovalente **101** se comportó como un inhibidor débil (K_i 322 μM) y el derivado dodecavalente **102** se comportó como un inhibidor potente en el rango submicromolar (K_i 0.15 μM), es espectacular ya que implica un aumento de la potencia de inhibición de 2150 veces (179 veces por unidad de DNJ), constituyendo el primer ejemplo descrito en

la bibliografía con un efecto multivalente significativo en la inhibición de las glicosidasas.²⁶ Posiblemente, la distribución isotrópica de los ligandos alrededor de la plataforma esférica de [C₆₀] genera un aumento de la concentración local de las unidades de DNJ en el sitio activo de la enzima que dificulta la disociación del complejo. No obstante, otros mecanismos, como posibles interacciones con sitios alostéricos en la enzima, no pueden descartarse.

La comparación de los perfiles de inhibición del sistema dodecavalente fullereno-DNJ **102** y del iminoazúcar trivalente previamente descrito (**DNJ**)₃ (Figura 1.11) muestra que, en ambos casos, el efecto inhibitorio multivalente más importante se manifiesta frente a la α -Manasa, pero con intensidades muy diferentes (6 veces para (**DNJ**)₃ y 2150 para **102**), lo que pone de manifiesto la importancia de la naturaleza de la plataforma empleada y de la valencia más allá del sistema y del efecto estadístico debido al aumento en el número de motivos de reconocimiento.

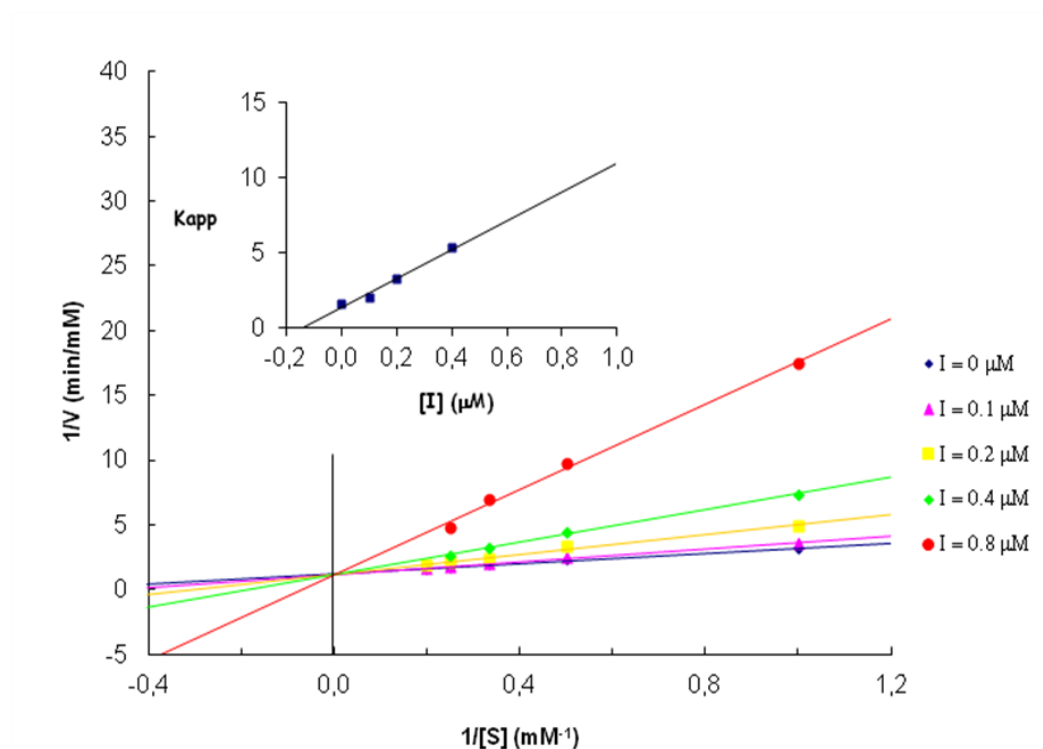


Figura 6.11. Representación de tipo Lineweaver-Burk para la determinación de K_i (0.15 μM) de **102** frente a la α -Manasa (judía Jack; pH 5.5).

6.3. Síntesis y evaluación de iminoazúcares multivalentes basados en β -ciclodextrina.

Los resultados comentados en el apartado anterior muestran que el efecto inhibidor multivalente sólo se observa para determinadas enzimas y que depende de la arquitectura del sistema. Con objeto de profundizar en el estudio de la influencia de diferentes parámetros estructurales como la valencia, la longitud del espaciador que conecta los motivos de iminoazúcar al núcleo central y la orientación espacial de los sustituyentes en las propiedades inhibitorias, hemos preparado y evaluado, en colaboración con el Prof. P. Compain de la Universidad de Estrasburgo, una serie de

derivados multivalentes de DNJ y del análogo de configuración D-*mano*, la 1-desoximanonojirimicina (DMJ), utilizando la β CD como plataforma (Figura 6.12). La β CD es un oligómero cíclico constituido por 7 unidades de D-glucopiranosas enlazadas por uniones α -(1,4), con una estructura tridimensional troncocónica que define una cavidad hidrófoba. En la base menor de esta estructura se localizan los hidroxilos primarios (OH-6), en tanto que en la base mayor lo hacen los grupos hidroxilos secundarios (OH-2 y OH-3). La posibilidad de funcionalizar de manera regioselectiva los diferentes hidroxilos ofrece la oportunidad de preparar derivados totalmente sustituidos en la cara primaria de la β CD, en la cara secundaria o en ambas caras simultáneamente.²⁷

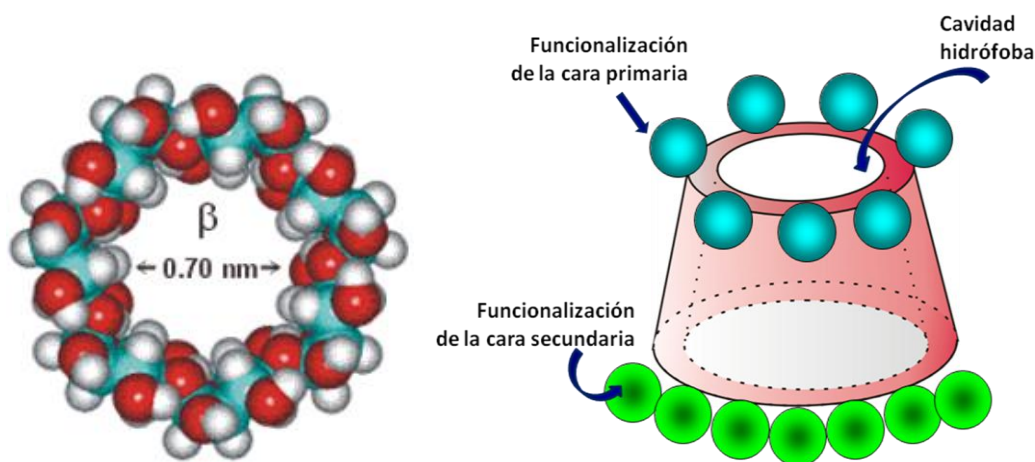
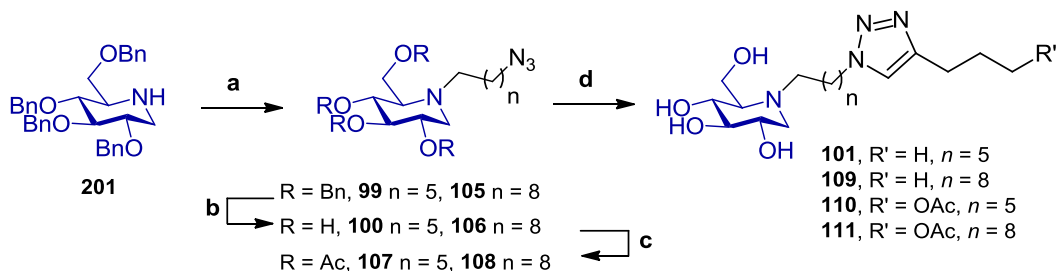


Figura 6.12. Estructura general de la β CD con indicación del tamaño de la cavidad y la posibilidad de funcionalizar ambas caras de modo diastereoselectivo.

Para la preparación de los sistemas multivalentes se ha considerado la DNJ como ligando de referencia, y se han preparado derivados que incorporan espaciadores de diferente longitud (C_6 y C_9) funcionalizados con un grupo azida en el extremo, y derivados de β CD propargilados en la cara primaria, en la cara secundaria o en ambas como precursores. El acoplamiento de tipo CuAAC ha permitido acceder a conjugados

homogéneos heptavalentes y tetradecavalentes con simetría C_7 y con diferente topología.²⁸

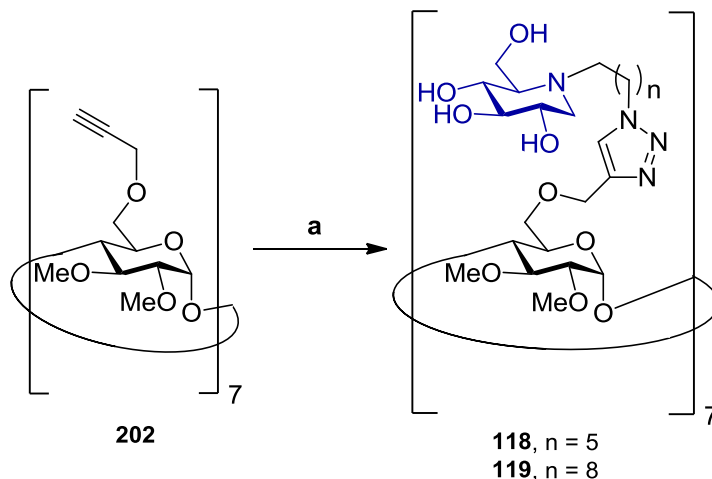
Para la preparación de los derivados *N*-azidohexil(nonil)-DNJ **99** y **105**, se ha empleado un procedimiento optimizado respecto al descrito con anterioridad²⁶ (Esquema 6.3). Mientras que la reacción de *N*-alquilación de **201** transcurrió con un rendimiento inferior al 40% después de tres días a 120 °C en DMF, la reacción en MeCN empleando un reactor de microondas a 120 °C durante 4 h permitió obtener **99** con un rendimiento del 81%. La desbencilación selectiva, empleando BCl_3 , de **99** y de **105** seguida de acetilación condujo a los precursores per-*O*-acetilados **107** y **108** con excelentes rendimientos. El acoplamiento de los derivados **100** y **106**, provistos de un grupo azida, con 1-pentino o acetato de pent-4-inilo en presencia de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y ascorbato sódico condujo a los correspondientes *N*-alquiltriazoles monovalentes **101** y **109-111**, que fueron utilizados como compuestos de referencia en los ensayos de inhibición enzimática.



Esquema 6.3. Síntesis de *N*-alquilazidas y *N*-alquiltriazoles derivados de DNJ. Reactivos y condiciones: a, $\text{Br}(\text{CH}_2)_n\text{N}_3$, K_2CO_3 , CH_3CN , MW, 150 °C, 81% (**99**), 65% (**105**); b, BCl_3 , CH_2Cl_2 , -60 °C a 0 °C, 77% (**100**), 79% (**106**); c, Ac_2O , py, DMAP, 91% (**107**), 83% (**108**); d, 1-pentino o acetato de pent-4-inilo, ascorbato sódico, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 2,6-lutidina, $\text{THF-H}_2\text{O}$ 1:1, 61% (**101**), 54% (**109**), 67% (**110**), 61% (**111**).

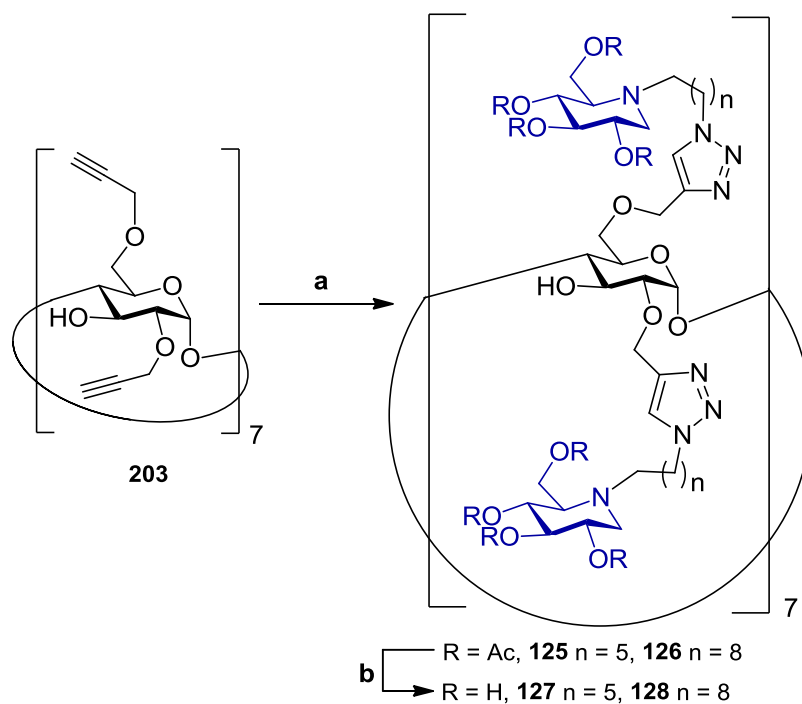
Las reacciones de acoplamiento para obtener los conjugados multivalentes se han llevado a cabo utilizando las mismas condiciones de reacción pero partiendo de los derivados de βCD hepta-(*O*-6)- **202**,²⁹ tetradeca-(*O*-2, *O*-6)- **203**³⁰ y tetradeca-(*O*-2, *O*-3)-propargilados **204**³¹. Así, la cicloadición azida-alquino catalizada por Cu (I) asistida por

radiación microondas entre el compuesto **202** y las *N*-alquilazidas **100** o **106** se llevó a cabo en presencia de 2,6-lutidina³² y dio lugar a los correspondientes conjugados heptavalentes **118** y **119** con un 42-48% de rendimiento (Esquema 6.4).³³

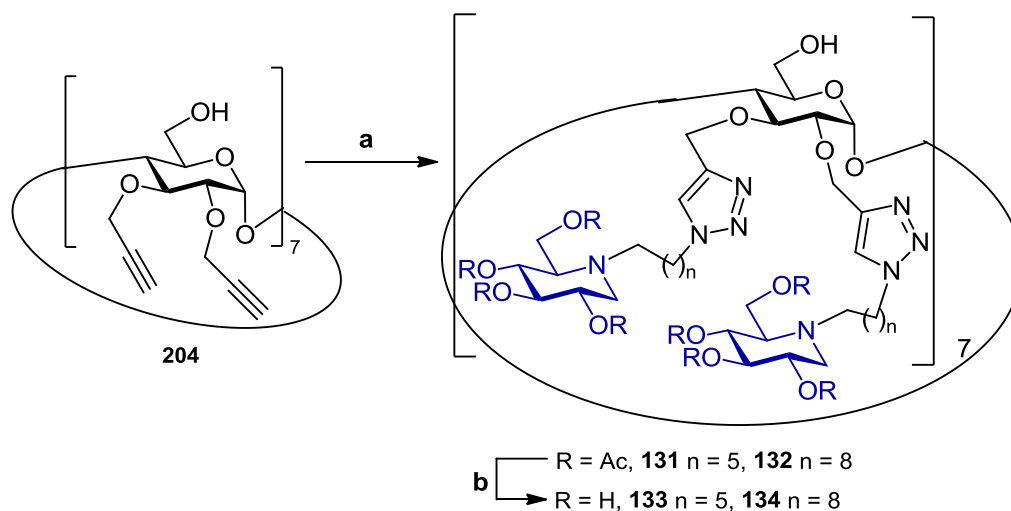


Esquema 6.4. Preparación de conjugados heptavalentes DNJ- β CD. Reactivos y condiciones: a, **100** o **106**, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, ascorbato sódico, 2,6-lutidina, THF- H_2O 1:1, MW, 120 °C, 48% (**118**), 42% (**119**).

El acoplamiento múltiple de tipo CuAAC de la β CD per-(*O*-2,*O*-6)-tetradecapropargilada **203** con las *N*-alquilazidas **107** y **108**, seguido de desacetilación, permitió obtener los derivados tetradecavalentes **127** y **128** con buenos rendimientos (Esquema 6.5).³³ Estos conjugados presentan las unidades de iminoazúcar distribuidas entre la cara primaria y la cara secundaria de la β CD. Los derivados tetradecavalentes **133** y **134**, sustituidos exclusivamente en la cara secundaria, se obtuvieron de modo análogo a partir de la β CD per-(*O*-2,*O*-3)-tetradecapropargilada **204** (Esquema 6.6).³⁴ Todos los aductos β CD-DNJ se caracterizaron mediante los métodos espectroscópicos habituales. En particular, los espectros de ^1H y ^{13}C RMN fueron consistentes con la distribución simétrica de los ligandos DNJ y los espectros MALDI mostraron las señales correspondientes a los iones pseudomoleculares.

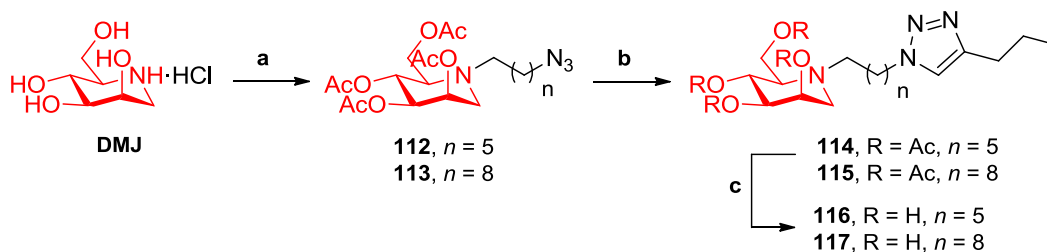


Esquema 6.5. Síntesis de conjugados tetradecavalentes DNJ-βCD funcionalizados en las caras primaria y secundaria de la βCD. Reactivos y condiciones: a, **107** o **108**, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, ascorbato sódico, DMF- H_2O 1:1, MW, 80 °C, 62% (**125**), 54% (**126**); b, Amberlita IRA 400 (OH^-), MeOH- H_2O 1:1, 96 % (**127**), 85% (**128**).



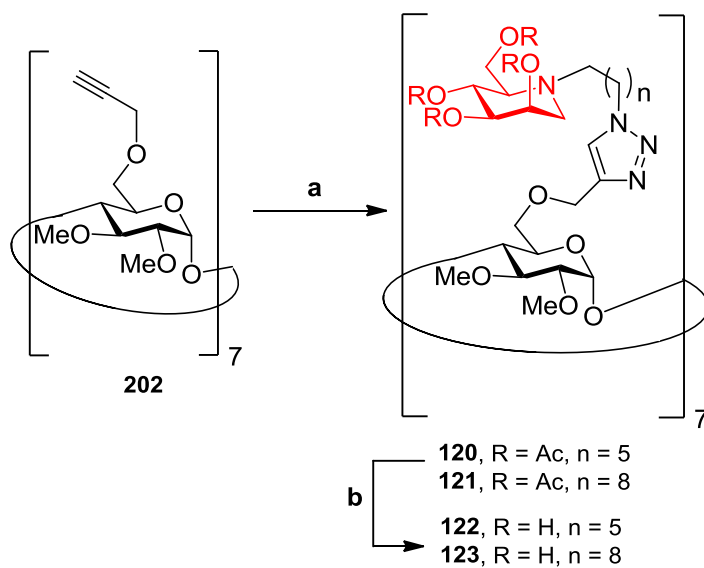
Esquema 6.6. Síntesis de conjugados tetradecaivalentes DNJ-βCD funcionalizados en la cara secundaria de la βCD. Reactivos y condiciones: a, **107** o **108**, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, ascorbato sódico, DMF- H_2O 4:1, MW, 80 °C, 36% (**131**), 65% (**132**); b, Amberlita IRA 400 (OH⁻), MeOH- H_2O 1:1, 85 % (**133**), 100% (**134**).

Para estudiar la influencia de la naturaleza del motivo de reconocimiento en la potencia de inhibición, se ha preparado además una serie de conjugados mono- y multivalentes basados en la DMJ.³⁴ El perfil configuracional de este iminoazúcar es análogo a la D-manosa y, por tanto, puede considerarse como un ligando complementario de la α -Manasa, la enzima para la que se ha observado un efecto inhibitorio multivalente más acusado en los trabajos anteriores. Los conjugados monovalentes de referencia **116** y **117** se obtuvieron siguiendo una estrategia paralela a la comentada para los derivados de DNJ. De acuerdo con la ruta sintética indicada en el Esquema 6.7, la alquilación del hidrocloreuro de DMJ comercial con las monobromoalquilazidas de seis y nueve átomos de carbono en DMF y en presencia de K_2CO_3 a 90 °C, seguida de peracetilación, condujo a las *N*-alquilazidas **114** y **115** con rendimientos del 78% y 86%, respectivamente. El acoplamiento tipo clic CuAAC de **112** y **113** con 1-pentino en presencia de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y ascorbato sódico dió lugar a los *N*-alquiltriazoles **114** y **115** que, por desacetilación convencional, condujeron a los conjugados monovalentes **116** y **117** (Esquema 6.7).



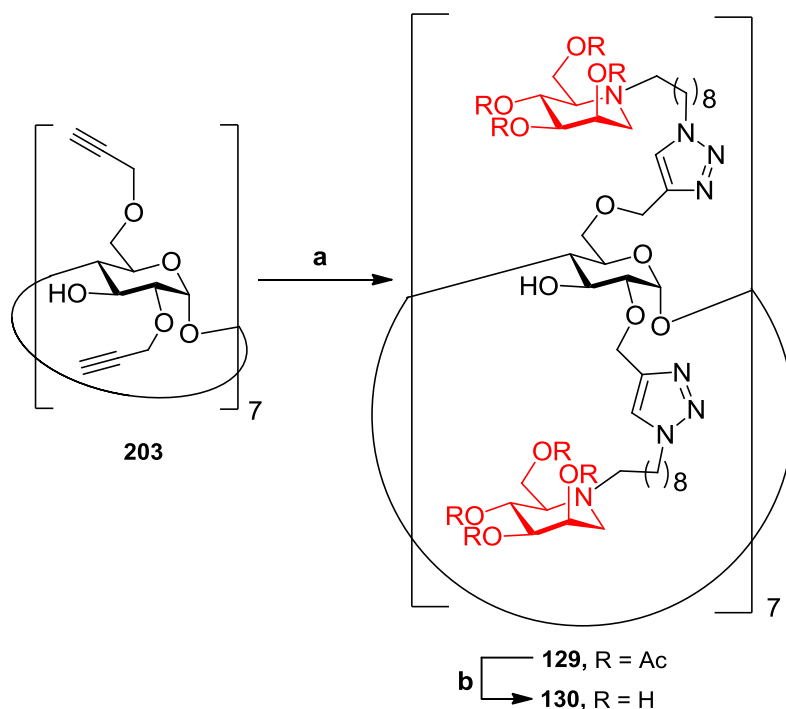
Esquema 6.7. Síntesis de conjugados monovalentes derivados de DMJ. Reactivos y condiciones: a, 1. $\text{BrCH}_2(\text{CH}_2)_n\text{N}_3$, K_2CO_3 , DMF, $90\text{ }^\circ\text{C}$, 2. Ac_2O , py, DMAP, 78% (**112**), 86% (**113**); b, 1-pentino, ascorbato sódico, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, DMF- H_2O 4:1, 72% (**114**), 52% (**115**); c, Amberlita IRA 400 (OH^-), $\text{MeOH-H}_2\text{O}$ 1:1, 85 % (**116**), 99% (**117**).

La preparación de los derivados heptavalentes de βCD **120** y **121**, se llevó a cabo de modo análogo a partir de la heptakis(2,3-di-*O*-metil-6-*O*-propargil)ciclomaltoheptaosa **202**²⁹ y las *N*-alquilazidas **112** y **113** usando $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y ascorbato sódico en DMF- H_2O 4:1. La desacetilación posterior condujo a los productos desprotegidos **122** y **123** con rendimientos del 87% y 91% (Esquema 6.8).



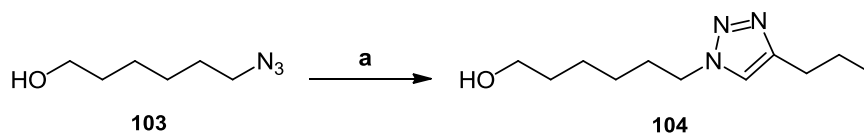
Esquema 6.8. Síntesis de conjugados heptavalentes DMJ-βCD. Reactivos y condiciones: a, **112** o **113**, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, ascorbato sódico, DMF- H_2O 4:1, MW, 80 °C, 52% (**120**), 94% (**121**); b, Amberlita IRA 400 (OH^-), MeOH- H_2O 1:1, 87 % (**122**), 91% (**123**).

También se ha preparado el derivado tetradecavalente DMJ-βCD **130**, funcionalizado en las posiciones *O*-2 y *O*-6 de la βCD e incorporando el espaciador de nueve átomos de carbono. Como se muestra en el Esquema 6.9, el acoplamiento múltiple entre el derivado de la βCD **203**³⁰ y la *N*-alquilazida **113**, seguido de desacetilación bajo condiciones de Zemplén, permitió aislar **130** con un rendimiento del 67%.

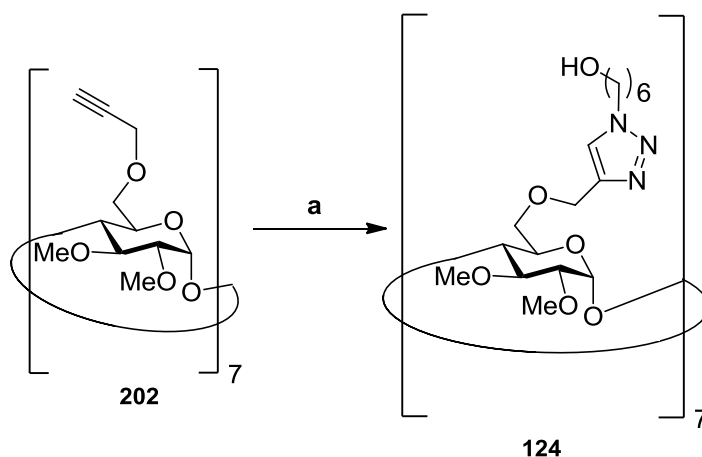


Esquema 6.9. Síntesis del conjugado tetradecavalente DMJ-βCD funcionalizado en las caras primaria y secundaria de la βCD. Reactivos y condiciones: a, **113**, CuSO₄·5H₂O, ascorbato sódico, DMF-H₂O 4:1, MW, 80 °C, 67% (**129**); b, Amberlita IRA 400 (OH⁻), MeOH-H₂O 1:1, 100% (**130**).

Como controles adicionales, y con objeto de valorar la posible influencia del segmento de unión entre las unidades de iminoazúcar y la plataforma de βCD y del núcleo politriazólico en la unión a las enzimas, se prepararon además los derivados monovalente **104** y heptavalente **124**, en los que formalmente se han sustituido las unidades de iminoazúcar por grupos hidroxilos (Esquemas 6.10 y 6.11).



Esquema 6.10. Síntesis del control monovalente **104**. Reactivos y condiciones: a, 1-pentino, CuSO₄·5H₂O, ascorbato sódico, DMF-H₂O 4:1, MW, 80 °C, 99%.



Esquema 6.11. Síntesis del control multivalente **124**. Reactivos y condiciones: a, **103**, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, ascorbato sódico, DMF- H_2O 4:1, MW, 80 °C, 63%.

Los espectros de ^1H y de ^{13}C RMN confirmaron las estructuras y la homogeneidad de los compuestos (Figura 6.13). Como se muestra en la Figura 6.14, el espectro de masas en modo MALDI-TOF mostró un único pico para el ión pseudomolecular (m/z 3911 para **119** en el caso del ejemplo seleccionado).

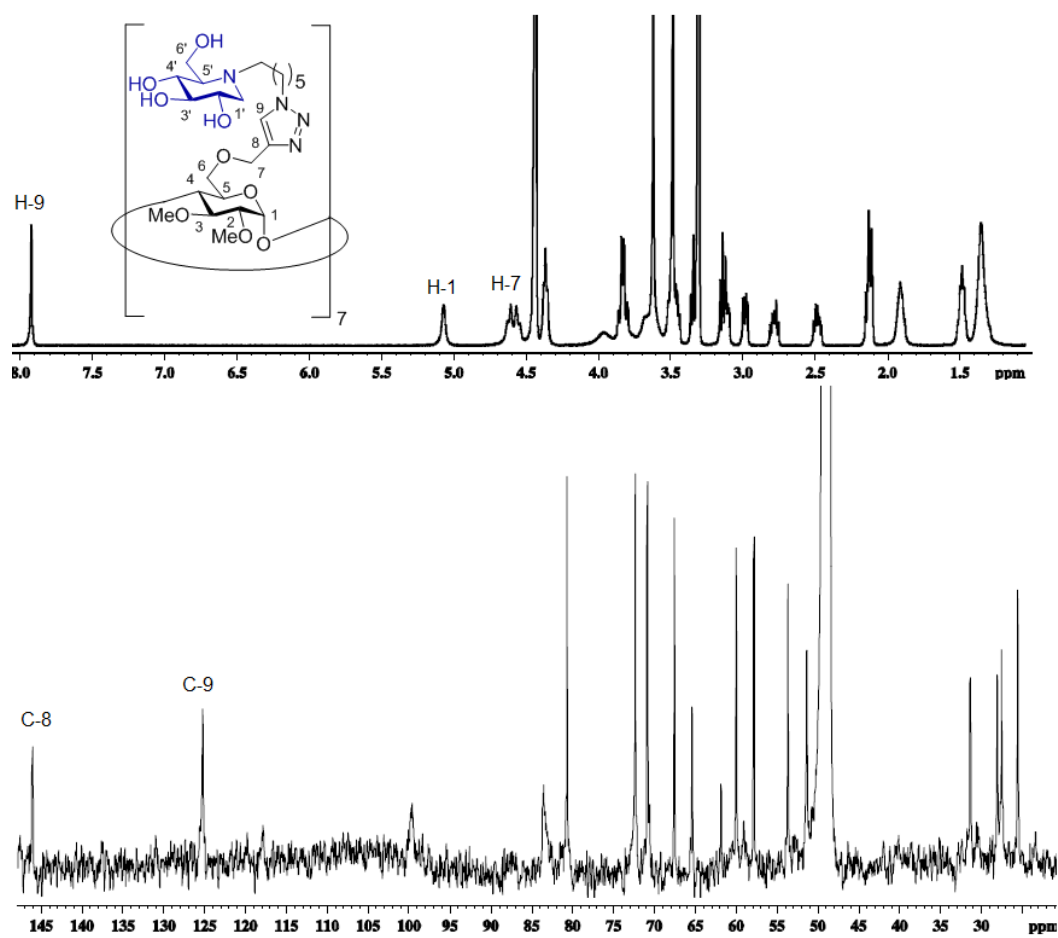


Figura 6.13. Espectros de ^1H y ^{13}C RMN (500 MHz, 333 K; 125.7 MHz, 313 K, CD_3OD) de **118**.

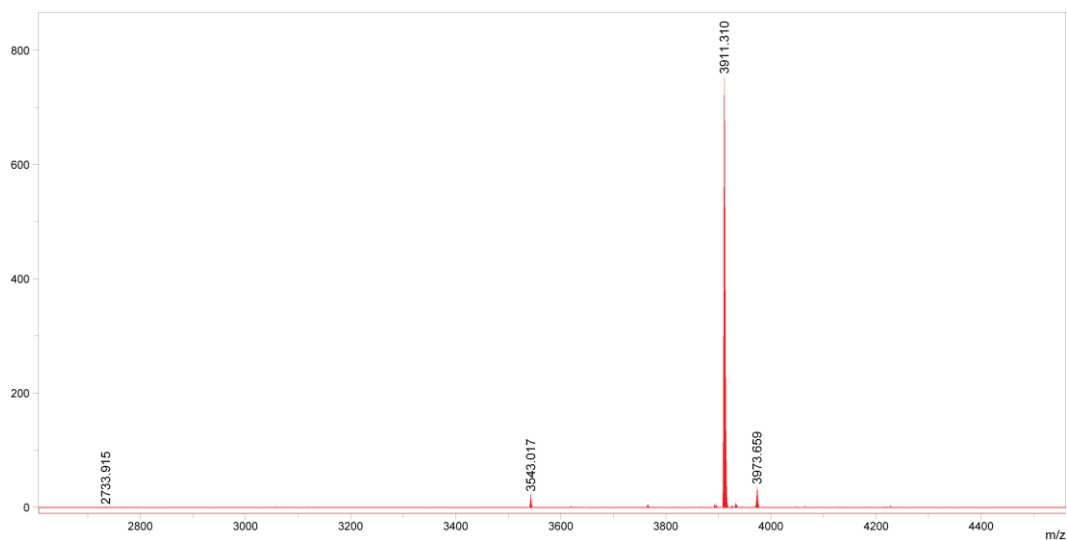


Figura 6.14. Espectro de masas en modo MALDI-TOF de **119**.

Los nuevos derivados mono y multivalentes fueron evaluados en nuestro laboratorio frente a un panel de glicosidasas comerciales que incluye α - y β -*Glcasas*, α - y β -*Galasas* y α - y β -*Manasas*. Los valores de la constante de inhibición de los controles monovalentes de configuración D-*gluco* (derivados de DNJ) se recogen en la Tabla 6.2. Todos los derivados mostraron un modo de inhibición reversible y competitivo.

Tabla 6.2. Comparación de la actividad como inhibidores de glicosidasas (K_i , μM) para los derivados de DNJ monovalentes **101**, **109-111**.^a

ENZIMAS	Derivados de DNJ monovalentes			
	101	109	110	111
α-Glcasa				
Levadura	152	116	395	192
Isomaltasa	943	154	n.i.	370
Amiloglucosidasa	0.71	1.7	2.8	1.7
β-Glcasa				
Hígado de buey	482	23	138	36
Almendra	11	11	15	15
Naringinasa	9.1	2.3	14	1.3
α-Galasa				
Grano verde de café	n.i.	544	207	351
α-Manasa				
Judía Jack	322	188	533	204

n. i. No se detectó inhibición. ^aNinguno de los compuestos mostró inhibición frente a la enzima β -Galasa (*E. Coli*) y β -Manasa (*Helix pomatia*).

La presencia de un sustituyente de tipo *N*-alquiltriazol en estos derivados no implicó un cambio en la afinidad y selectividad hacia las glicosidasas en comparación con el comportamiento de DNJ, con independencia de la presencia o ausencia de una función éster adicional en la cadena alquílica (**110** y **111**). Los derivados monovalentes se comportaron como inhibidores potentes y selectivos de algunas enzimas con actividad α -o β -Glcasa (por ejemplo K_i 0.71-2.8 μM frente a la amiloglucosidasa). Sin embargo, no mostraron inhibición frente a β -Galasa ni β -Manasa y sólo se detectó una inhibición moderada frente a enzimas con actividad α -Galasa y α -Manasa ($K_i > 200 \mu\text{M}$).

En el caso de los conjugados heptavalentes derivados de DNJ **118** y **119** (Tabla 6.3), el resultado más destacable fue el aumento de la potencia de inhibición frente a la α -Manasa, obteniéndose valores de K_i de 7.7 y 0.36 μM , respectivamente, lo que significa un incremento de 2-3 órdenes de magnitud respecto a los derivados monovalentes. Ambos derivados mostraron un modo de inhibición reversible y mixto frente a la α -Manasa. Es posible que la componente no competitiva de la inhibición pueda deberse a que la funcionalización exclusiva de la cara primaria de la βCD facilite la inclusión de residuos de aminoácidos cercanos al sitio activo de la enzima en la cavidad, sin que ello conlleve la ocupación del propio sitio activo (Figuras 6.15 y 6.16).

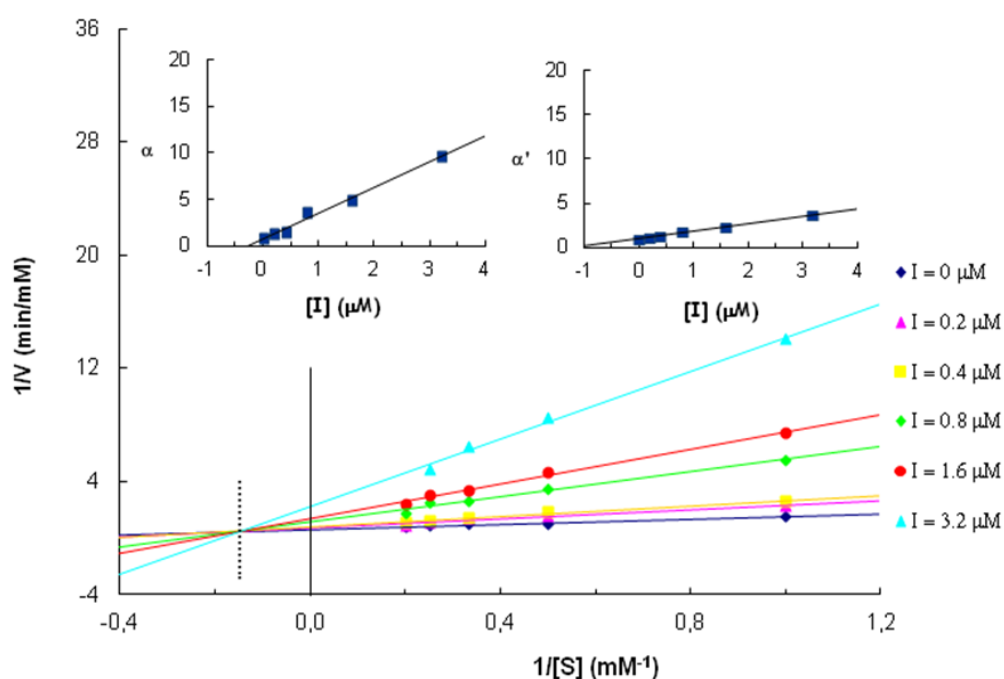


Figura 6.15. Representación de tipo Lineweaver-Burk Plot para la determinación de los valores de K_i (0.36 μM) y K_i' (1.2 μM) de **119** frente a la α -Manasa (judía Jack; pH 5.5).

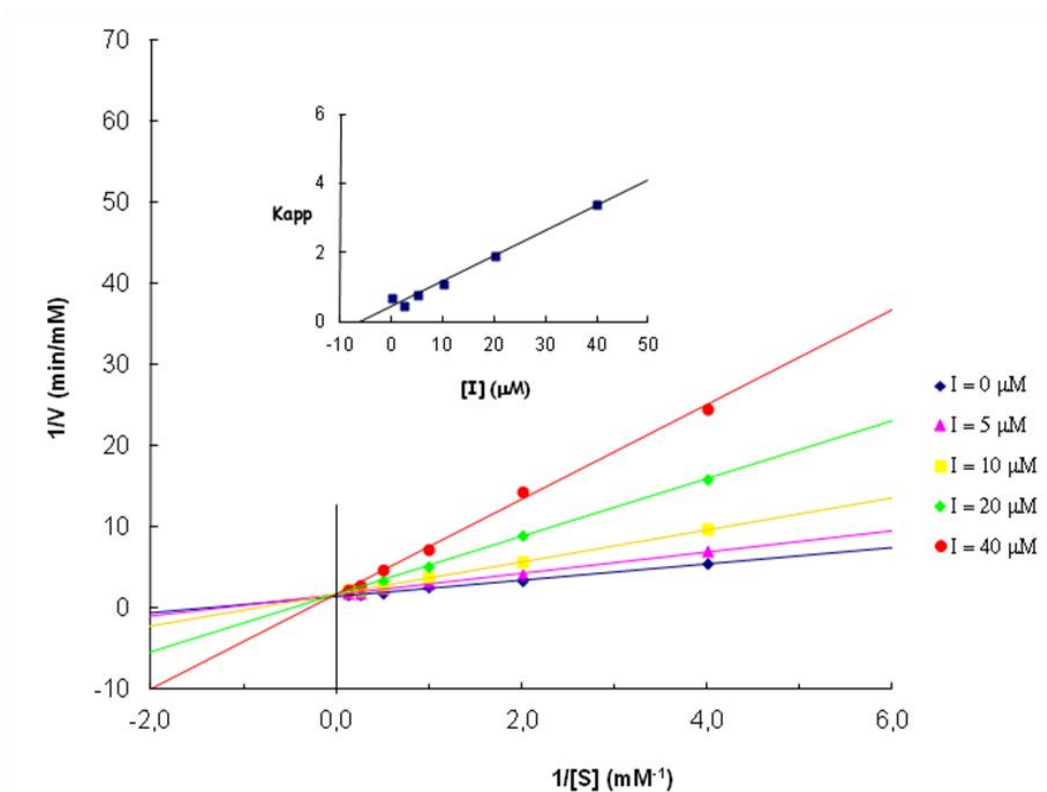


Figura 6.16. Representación de tipo Lineweaver-Burk Plot para la determinación del valor de K_i ($0.022 \mu\text{M}$) de **118** frente a la α -Manasa (judía Jack; pH 5.5).

Los derivados tetradecavalentes **127**, **128**, **133** y **134** mostraron un modo de inhibición reversible y competitivo, no observándose ninguna influencia de la orientación espacial de las unidades de DNJ entre las dos caras de la βCD (**127** y **128**) o exclusivamente en la cara secundaria (**133** y **134**) en la inhibición de α - y β -Glcasas y galactosidasas. El efecto de la longitud del espaciador también fue irrelevante frente a enzimas con actividad α -Glcasa, como por ejemplo la amiloglucosidasa.

En el caso de la α -Manasa, la potencia de inhibición aumentó drásticamente al pasar de los derivados heptavalentes a los derivados tetradecavalentes, hasta cuatro órdenes de magnitud para los derivados **128** y **134**, tetradecasustituidos en la cara

secundaria (K_i 22 nM y 68 nM, respectivamente), respecto al análogo monovalente **111**. Ésto supone un incremento de 480 y 2765 veces (34- y 197- veces en base molar), respectivamente. Es interesante destacar que el efecto inhibitorio multivalente fue menos acusado para los conjugados tetradecasustituidos **127** y **133**, con espaciadores de seis átomos de carbono, poniendo de manifiesto la importancia de parámetros estructurales como la valencia (7 o 14), la longitud del espaciador (6 o 9) y la orientación espacial de las unidades del iminoazúcar en la inhibición de las glicosidasas (Tabla 6.3).

Tabla 6.3. Comparación de la actividad como inhibidores de glicosidasas (K_i , μ M) para los conjugados DNJ- β CD.^a

ENZIMAS	Derivados heptavalentes			Derivados tetradecavalentes		
	118	119	127	128	133	134
α-Glcasa						
Levadura	760	234	270	62	n.i.	n.i.
Isomaltasa	256	74	63	18	n.i.	n.i.
Amiloglucosidasa	0.52	1.2	0.2	0.1	0.26	0.20
β-Glcasa						
Hígado de buey	139	35	25	4.0	113	57
Almendra	162	108	111	10	23	27
Naringinasa	8.7	0.23	5.2	0.14	14	0.56
α-Galasa						
Grano verde de café	33	6.1	28	9.0	26	16
α-Manasa						
Judía Jack	7.7	0.36	0.5	0.022	0.67	0.068

^aNinguno de los compuestos mostró inhibición frente a la enzima β -Glcasa (*E. Coli*) y β -Manasa (*Helix pomatia*).

El iminoazúcar DMJ es un inhibidor moderado de la α -Manasa (K_i 81 μ M). La incorporación de este motivo mediante CuAAC a un anillo de triazol utilizando espaciadores de diferente longitud (**116** y **117**) no afectó en gran medida la potencia de inhibición frente a esta enzima (K_i 118 y 111 μ M, respectivamente). En cambio, las constantes de inhibición de los derivados hepta-(*O*-6)- (**122** y **123**) y tetradeca-(*O*-2,*O*-6)-valentes (**130**), K_i 0.49, 0.73 y 0.07 μ M, respectivamente, indicaron un aumento de la afinidad de 241-, 153- y 1586-veces (34-, 22- y 113-veces en base molar; Tabla 6.4).

Tabla 6.4. Comparación de la actividad como inhibidores de glicosidasas (K_i , μ M) para los derivados monovalentes y multivalentes DMJ- β CD.^a

ENZIMAS	Derivados monovalentes		Derivados multivalentes		
	116	117	122	123	130
α-Glcasa					
Amiloglucosidasa	9.3	1.3	0.44	3.1	2.6
β-Glcasa					
Hígado de buey	67	53	11	20	34
Almendra	n.i.	174	114	261	143
Naringinasa	138	517	327	36	n.d.
α-Galasa					
Grano verde de café	n.i.	n.i.	n.i.	321	144
α-Manasa					
Judía Jack	118	111	0.49	0.73	0.07
β-Manasa					
<i>Helix Pomatia</i>	n.i.	n.i.	n.i.	72	n.i.

n.i. No se detectó inhibición. n.d. No determinado. ^aNinguno de los compuestos mostró inhibición frente a la enzima α -Glcasa (levadura), isomaltasa (levadura) y β -Galasa (*E. Coli*).

Finalmente, si comparamos la influencia de la naturaleza del iminoazúcar (DNJ vs DMJ) y la valencia del ligando (7 o 14) podemos concluir que tanto los conjugados hepta- como tetradecavalentes de DNJ y DMJ se comportan como excelentes inhibidores de la α -Manasa, a diferencia de sus análogos monovalentes (Tabla 6.5). El incremento más acusado se obtuvo en el caso de **128**, un derivado tetradecavalente de DNJ en el que las unidades de iminoazúcar se distribuyen entre las caras primaria y secundaria.

Tabla 6.5. Relación de potencias relativas frente a α -Manasa de judía Jack para los conjugados multivalentes DNJ- β CD y DMJ- β CD.

Derivados	Unidades DNJ	Unidades DMJ	Potencia relativa ^a	Potencia relativa [M]
118	7	-	42-69	6-10
119	7	-	522-567	75-81
127	14	-	644-1066	46-76
128	14	-	8546-9273	610-662
133	14	-	480	34
134	14	-	2765	197
122	-	7	241	34
123	-	7	153	22
130	-	14	1586	113

^aLos dos valores corresponden con la comparación con los monómeros no acetilados o acetilados, respectivamente.

6.4. Estudio termodinámico mediante calorimetría ITC.

Con objeto de profundizar en la comprensión de las interacciones multivalentes enzima-inhibidor, hemos llevado a cabo un estudio termodinámico mediante valoración por calorimetría isotérmica (*Isothermal Titration Calorimetry*, ITC) de los complejos formados por la α -Manasa de judía Jack y los derivados multivalentes de DNJ y DMJ

derivados de β CD hepta-(*O*-6)- (**119**, **123**), tetradeca-(*O*-2, *O*-6)- (**127**), tetradeca-(*O*-2, *O*-3)- (**133**, **134**) y el derivado dodecavalente de fullereno **120** (Figura 6.17).

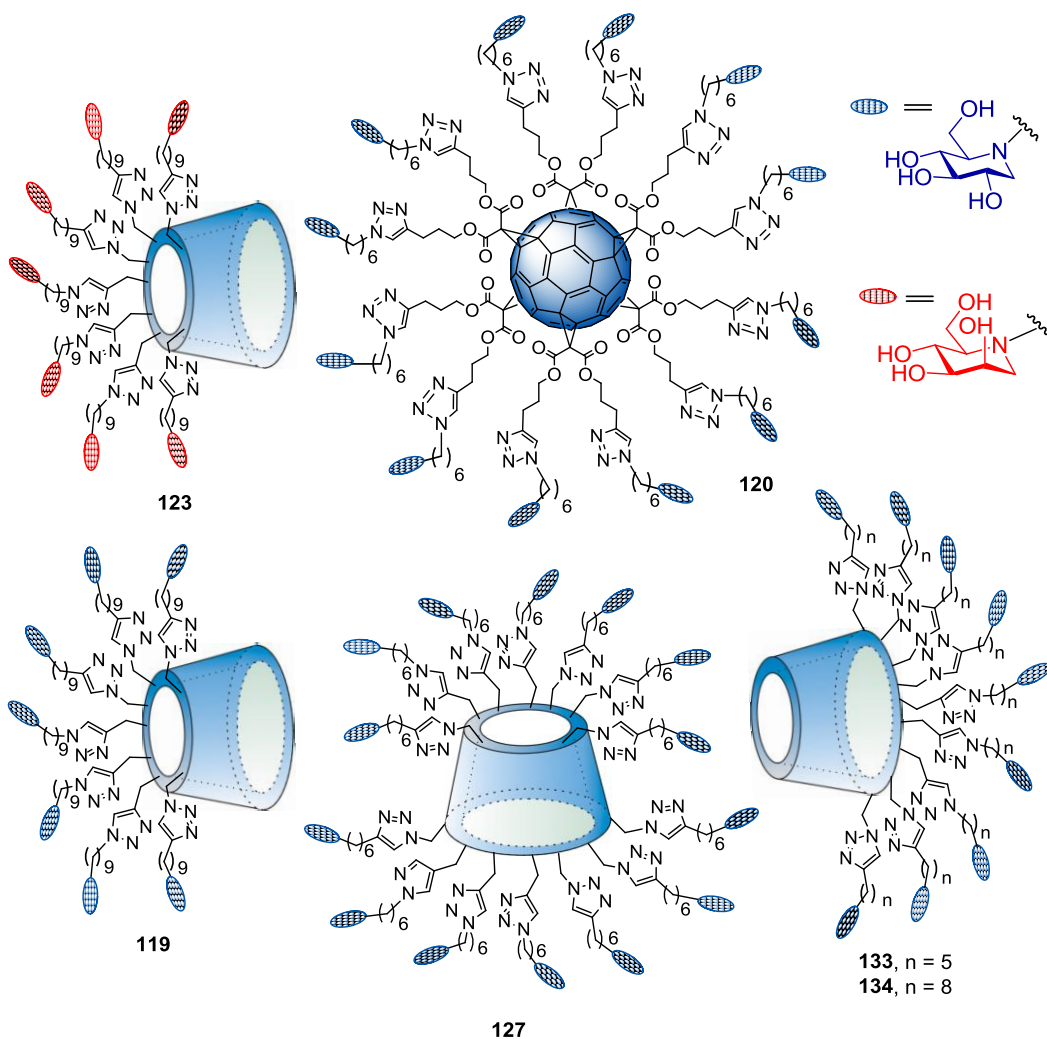


Figura 6.17. Estructuras de los derivados multivalentes incluidos en el estudio termodinámico mediante valoración ITC.

La ITC es una técnica que nos permite determinar todos los parámetros termodinámicos (afinidad, energía libre, entalpía, entropía y estequiometría) de la

interacción entre un ligando y un receptor haciendo uso de las ecuaciones $\Delta G = -R \cdot T \cdot \ln K_a = \Delta H - T \cdot \Delta S$, siendo K_a la constante de asociación E-I y T la temperatura en kelvin. Para poder extraer conclusiones válidas, la relación [concentración de proteína]/ K_D debe ser cercana a 10-50, siendo K_D el valor de K_i determinado por métodos cinéticos.³⁵ Por este motivo no fue posible determinar las constantes de disociación de los complejos enzima-inhibidor correspondientes a los monómeros, tanto de configuración D-*gluco* como D-*mano*, ya que la presentación comercial de la α -Manasa no permite disponer de una concentración de enzima suficiente. El derivado heptavalente **118** tampoco fue incluido en este estudio ya que, aunque se comportó como un inhibidor potente de α -Manasa (K_i 7.7 μ M), el valor de K_i no fue suficientemente bajo. Todos los experimentos se llevaron a cabo en el Instituto de Investigaciones Químicas de Sevilla (CSIC-Universidad de Sevilla) empleando un microcalorímetro CSC Model 5300 Nano-ITC III. La valoración se realizó a pH 5.5 y 25 °C por inyección de alícuotas de una disolución del inhibidor a la celda que contenía la disolución de la α -Manasa.

En la Tabla 6.6 se recogen los valores de los parámetros termodinámicos obtenidos. Los resultados indican que a medida que aumenta la afinidad del inhibidor por la enzima, la interacción está más favorecida termodinámicamente. En la mayor parte de los casos, las valoraciones isotérmicas fueron compatibles con una estequiometría de unión 1:1 (basada en la razón molar inhibidor/enzima en el punto de inflexión de la curva de valoración) excepto para los derivados de fullereno **102** y de β CD **134**, que mostraron un valor de E/I de 1.75 y 2.30, respectivamente. Las constantes de disociación K_D determinadas mediante esta técnica para los derivados tetradecavalentes **133** y **134** fueron acordes a las obtenidas cinéticamente aunque ambos derivados mostraron contribuciones entálpicas y entrópicas muy diferentes. El término entálpico fue muy favorable en todos los casos, lo que permite deducir que la unión está dirigida entálpicamente, siendo el término entrópico favorable en la mayoría de los casos. El derivado **134**, con un espaciador de nueve átomos de carbono, presentó una penalización entrópica muy

elevada ($T\Delta S = -84.2 \text{ KJ}\cdot\text{mol}^{-1}$), compensada por un término entálpico muy favorable ($\Delta H = -124.1 \text{ KJ}\cdot\text{mol}^{-1}$). Por el contrario, el derivado **133** mostró contribuciones entrópicas y entálpicas favorables ($T\Delta S = +2.8 \text{ KJ}\cdot\text{mol}^{-1}$; $\Delta H = -28.4 \text{ KJ}\cdot\text{mol}^{-1}$), lo que refleja la importancia de la influencia del reordenamiento de las moléculas de agua cercanas al sitio activo de la enzima para el derivado **134** con el espaciador C_9 . Por otra parte, la topología de los derivados parece no tener una gran influencia en los parámetros termodinámicos. Los derivados **127** y **133**, funcionalizados con 14 unidades de DNJ aunque distribuidas de forma diferente sobre la β CD, presentan contribuciones entálpicas y entrópicas muy similares ($T\Delta S = +0.73 \text{ KJ}\cdot\text{mol}^{-1}$; $\Delta H = -31.7 \text{ KJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ para **127** y $T\Delta S = +2.8 \text{ KJ}\cdot\text{mol}^{-1}$; $\Delta H = -28.4 \text{ KJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ para **133**). El termograma y la isoterma de unión del derivado heptavalente **119** a la α -Manasa se muestran en la Figura 6.18.³⁴

Tabla 6.6. Parámetros termodinámicos de la interacción entre conjugados multivalentes de DNJ y DMJ y la α -Manasa.

	ΔG $\text{KJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	ΔH $\text{KJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	$T\cdot\Delta S$ $\text{KJ}\cdot\text{mol}^{-1}$	K_D μM	n L/P
DNJ-[C₆₀]					
102	-40.3	-38.2 ± 2.9	+2.2	0.084 ± 0.0057	1.75
DNJ-βCD					
133 (14 DNJ)	-31.2	-28.4 ± 4.9	+2.8	3.3 ± 1.78	1.01
127 (14 DNJ)	-32.4	-31.7 ± 3.7	+0.73	2.08 ± 0.87	1.09
119 (7 DNJ)	-37.0	-41.9 ± 2.4	-4.9	0.33 ± 0.150	1.19
134(14 DNJ)	-39.9	-124.1 ± 28.0	-84.2	0.1 ± 0.096	2.30
DMJ-βCD					
123 (7 DMJ)	-38.1	-39.8 ± 2.6	-1.7	0.21 ± 0.093	1.40

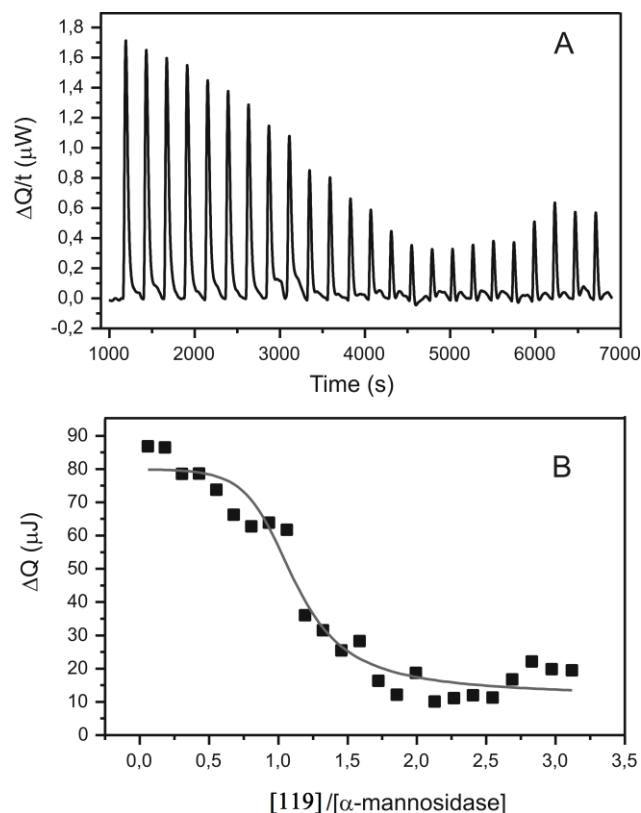


Figure 6.18. (A) Termograma e (B) isoterma de unión de **119** y α -Manasa (pH 5.5, 25 °C).

El análisis del conjunto de datos revela una compensación entálpica-entrópica que puede ser atribuida a mecanismos de disociación común del complejo enzima-iminoazúcar multivalente, análogo al observado para la disociación en el caso de muchos fármacos.³⁶ En consecuencia, la variación de energía libre (ΔG) muestra valores en el mismo orden de magnitud (-31.2 a -39.9 KJ mol⁻¹) y se observó una relación lineal entre las variaciones de entropía (ΔS) y de entalpía (ΔH) con un coeficiente de correlación ($r^2 = 0.9952$) que corrobora la existencia de esta compensación (Figura 6.19).

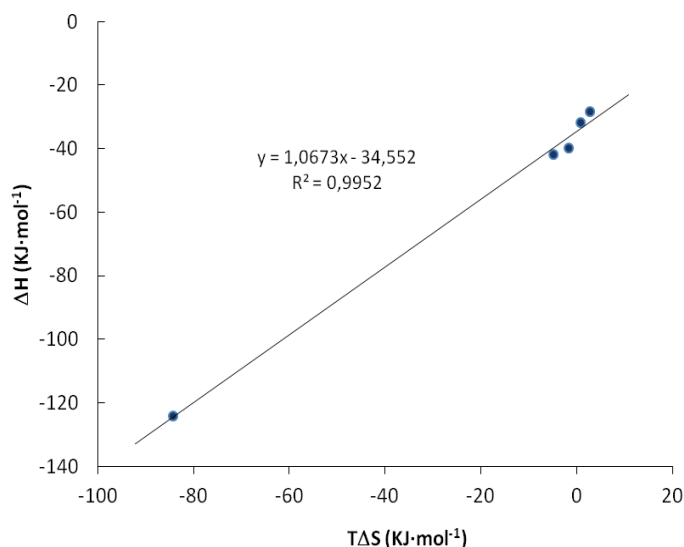


Figura 6.19. Representación gráfica de ΔH vs $T\Delta S$ en las interacciones de la enzima α -Manasa con los derivados multivalentes β CD-DNJ **102**, **119**, **127**, **133** y **134** y β CD-DMJ **123**.

Recientemente, Compain *et al.* han descrito resultados prometedores relativos a la actividad como PCs de los inhibidores multivalentes basados en β CD^{37, 38}. Estos derivados incrementan hasta un 50% la actividad residual de la GlcCasa mutante N370S, la mutación de mayor prevalencia en GD. Este incremento de actividad de la GlcCasa en fibroblastos de Gaucher demuestra de manera inequívoca la capacidad de los complejos entre los iminoazúcares multivalentes y la enzima para escapar del RE y alcanzar los lisosomas. Resultados preliminares muestran además que los clústeres de DNJ son también eficaces para resolver el defecto de procesamiento de la proteína mutante CTFR implicada en la fibrosis quística (CF), resultando más eficaces como correctores de la CFTR que el candidato clínico miglustat (*N*-Bu DNJ).^{39, 40} La inhibición de las glucosidasas I y II del ER por el miglustat previene la interacción de la proteína CTFR mutante F508 con la calnexina, impidiendo su degradación por el mecanismo de control de calidad asociado al retículo endoplasmático (*Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation*, ERAD).⁴¹

¹ a) S.-K. Choi, *Synthetic Multivalent Molecules: concepts and biomedical applications* (Wiley, & Sons, New Jersey, 2004); b) C. Fasting, C. A. Schalley, M. Weber, O. Seitz, S. Hecht, B. Koksche, J. Dornedde, C. Graf, E.-W. Knapp, R. Haag, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 10472-10498.

² a) R. T. Lee, Y. Ichikawa, T. Kawasaki, K. Drickamer, Y. C. Lee, *Arch. Biochem. Biophys.* **1992**, *299*, 129-136; b) Y. C. Lee, R. T. Lee, *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 321-327; c) H. Lis, N. Sharon, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 637-674; d) J. J. Lundquist, E. J. Toone, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 555-578; e) M. Ambrosi, N. R. Cameron, B. G. Davis, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 1593-1608; f) T. K. Dam, C. F. Brewer, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **2010**, *63*, 139-164; g) V. Roldós, F. J. Cañada, J. Jiménez-Barbero, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 990-1005.

³ a) M. Lahmann, *Top. Curr. Chem.* **2009**, *288*, 17-65; b) D. Deniaud, K. Julienne, S. G. Gouin, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 966-979; c) R. J. Pieters, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 2013-2025; d) Y.-B. Lim, M. Lee, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 401-405; e) L. L. Kiessling, J. E. Gestwicki, L. E. Strong, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 2348-2368; f) A. L. Baldini, A. Casnati, F. Sansone, R. Ungaro, *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 254-266; g) A. Imbert, Y. Chabre, R. Roy, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 7490-7499; h) R. Roy, *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **2003**, *15*, 291-310; i) R. Roy, M.-G. Baek, *Rev. Mol. Biotechnol.* **2002**, *90*, 291-309; j) N. Röckendorf, T. K. Lindhorst, *Top. Curr. Chem.* **2001**, *217*, 201-2038; k) Y. M. Chabre, R. Roy, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **2010**, *63*, 165-393; l) M. Hartmann, T. K. Lindhorst, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 3583-3609; m) N. Jayaraman, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 3463-3483.

⁴ a) M. Mammen, S.-K. Choi, G. M. Withesides, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2754-2794; b) J. E. Gestwicki, C. W. Cairo, L. E. Strong, K. A. Oetjen, L. L. Kiessling, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 14922-14933; c) L. Kiessling, J. E. Gestwicki, L. E. Strong, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 696-703.

-
- ⁵ S. Cecioni, O.-A. Argintaru, T. Dosca, P. Gergely, J.-P. Praly, S. Vidal, *New J. Chem.* **2009**, *33*, 148-156.
- ⁶ a) T. Wennekes, R. J. B. H. N. van den Berg, K. M. Bongers, W. E. Donker-Koopman, A. Ghisaidoobe, G. A. Van der Marel, A. Strijland, J. M. F. G. Aerts, H. S. Overkleeft, *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, *20*, 836-846; b) A. Lohse, K. B. Jensen, K. Lundgren, M. Bols, *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 1965-1971; c) B. A. Johns, C. R. Johnson, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 749-752.
- ⁷ J. Diot, M. I. García-Moreno, S. G. Gouin, C. Ortiz Mellet, K. Haupt, J. Kovensky, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 357-363.
- ⁸ a) J. W. Dennis, K. Koch, S. Yousefi, I. VanderElst, *Cancer. Res.* **1990**, *50*, 1867-1872; b) P. E. Goss, C. L. Reid, D. Bailey, J. W. Dennis, *Clin. Cancer Res.* **1997**, *3*, 1077-1086.
- ⁹ H. W. Kroto, J. R. Heath, S. C. O'Brien, R. F. Curl, R. E. Smalley, *Nature*, **1985**, *318*, 162-163.
- ¹⁰ a) S. Iijima, *Nature* **1991**, *354*, 56-58; b) S. Iijima, T. Ichihashi, *Nature* **1993**, *363*, 603-605; c) D. S. Bethune, C. H. Klang, M. S. de Vries, G. Gorman, R. Savoy, J. Vasquez, R. Beyers, *Nature* **1993**, *363*, 605-607.
- ¹¹ K. S. Novoselov, A. K. Geim, S. V. Morozov, D. Jiang, Y. Zhang, S. V. Dubonos, I. V. Grigorieva, A. A. Firsov, *Science* **2004**, *306*, 666-669.
- ¹² H. Prinzbach, A. Weiler, P. Landenberger, F. Wahl, J. Wörth, L. T. Scott, M. Gelmont, D. Olevano, B. V. Issendorff, *Nature* **2000**, *407*, 60-63.
- ¹³ M. Swart, S. Osuna, M. García-Borràs, J. M. Luis, M. Solá, *An. Quim.* **2013**, *109*, 11-19.
- ¹⁴ D. M. Guldi, N. Martín, Cap. 5.13, *Comprehensive Nanoscience and Technology*, vol. 5, Elsevier, **2011**, p. 379 AQ5 .
- ¹⁵ a) A. Hirsch, M. Brettreich, *Fullerenes: Chemistry and Reactions*, ed. John Wiley & Sons, **2005**; b) M. A. Yurovskaya, I. V. Trushkov, *Russ. Chem. Bull. Int. Ed.*, **2002**, *51*, 367-443.

-
- ¹⁶ C. Bingel, *Chem. Ber.* **1993**, *126*, 1957-1959.
- ¹⁷ A. Hirsch, O. Vostrowsky, *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, *5*, 829-848.
- ¹⁸ J. Iehl, J.-F. Nierengarten, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 7306-7309.
- ¹⁹ a) H. Li, A. Kitaygorodskiy, R. A. Carino, Y. P. Sun, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 859-861; b) H. Li, S. A. Haque, A. Kitaygorodskiy, M. J. Meziani, M. T. Castillo, Y.-P. Sun, *Org. Lett.*, **2006**, *8*, 5641-5643.
- ²⁰ J.-F. Nierengarten, J. Iehl, V. Oerthel, M. Holler, B. M. Illescas, A. Muñoz, N. Martín, J. Rojo, M. Sánchez-Navarro, S. Cecioni, S. Vidal, K. Buffet, M. Durka, S. P. Vincent, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 3860-3862.
- ²¹ M. Durka, K. Buffet, J. Iehl, M. Holler, J.-F. Nierengarten, S. P. Vincent, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 641-651.
- ²² D. Sigwalt, M. Holler, J. Iehl, J.-F. Nierengarten, M. Nothisen, E. Morinb, J.-S. Remy, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 4640-4642.
- ²³ a) H. S. Overkleeft, J. vanWiltburg, U. K. Pandit, *Tetrahedron* **1994**, *50*, 4215-4224; b) V. Hoos, A. B. Naughon, A. Vasella, *Helv. Chim. Acta* **1993**, *76*, 1802-1807.
- ²⁴ S. Desvergnès, Y. Vallée, S. Py, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 2967-2970.
- ²⁵ a) R. Huisgen, *Pure Appl. Chem.* **1989**, *61*, 613-628; b) R. Huisgen, W. Szeimies, L. Moebius, *Chem. Ber.* **1967**, *100*, 2494-2507; c) C. W. Tornøe, M. Meldal, *Proceedings of the 2nd International and 17th American Peptide Symposium, Peptides: The Waves of the Future*, M. Lebl, R. A. Houghten (Eds.), San Diego, **2001**, 263-264; d) V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596-2599.
- ²⁶ P. Compain, C. Decroocq, J. Iehl, M. Holler, D. Hazelard, T. Mena Barragán, C. Ortiz Mellet, J.-F. Nierengarten, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 5889-5892; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 5753-5756.
- ²⁷ A. R. Khan, P. Forgo, K. J. Stine, V. T. D'Souza, *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1977-1996.
- ²⁸ Ejemplos de reacción CuAAC empleando β -CD como plataforma: a) J. Deng, N. Li, K. Mai, C. Yang, L. Yan, L.-M. Zhang, *J. Mater. Chem.* **2011**, *21*, 5273-5281; b) A. Megía-

- Fernández, M. Ortega-Muñoz, J. López-Jaramillo, F. Hernández-Mateo, F. Santoyo-González, *Adv. Synth. Catal.* **2010**, 352, 3306-3320; c) S. Srinivasachari, T. M. Reineke, *Biomaterials* **2009**, 30, 928-938; d) A. Méndez-Ardoy, M. Gómez-García, C. Ortiz Mellet, N. Sevillano, M. D. Girón, R. Salto, F. Santoyo-González, J. M. García Fernández, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, 7, 2681-2684; e) J. M. Bryson, W.-J. Chu, J.-H. Lee, T. M. Reineke, *Bioconjugate Chem.* **2008**, 19, 1505-1509; f) M. Ortega-Muñoz, J. Morales-Sanfrutos, F. Pérez-Balderas, F. Hernández-Mateos, M. D. Girón-González, N. Sevillano-Tripero, R. Salto-González, F. Santoyo-González, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, 5, 2291-2301; g) R. J. Pieters, D. T. S. Rijkers, R. M. J. Liskamp, *QSAR Comb. Sci.* **2007**, 26, 1181-1190.
- ²⁹ a) F. G. Calvo-Flores, J. Isac-García, F. Hernández-Mateo, F. Pérez-Balderas, J. A. Calvo-Asín, E. Sánchez-Vaquero, F. Santoyo-González, *Org. Lett.* **2000**, 2, 2499-2502; b) K. Takeo, H. Mitoh, K. Uemura, *Carbohydr. Res.* **1989**, 187, 203-221.
- ³⁰ F. Ortega-Caballero, J. J. Giménez-Martínez, A. Vargas-Berenguel, *Org. Lett.* **2003**, 5, 2389-2392.
- ³¹ S. Ward, C. -C. Ling, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 4853-4861.
- ³² D. D. Díaz, K. Rajagopal, E. Strable, J. Schneider, M. G. Finn, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 6056-6057.
- ³³ C. Decroocq, D. Rodríguez-Lucena, V. Russo, T. Mena Barragán, C. Ortiz Mellet, P. Compain, *Chem. Eur. J.* **2011**, 17, 13825-13831.
- ³⁴ A. Joosten, C. Decroocq, R. Sergeant, T. Mena Barragán, C. Ortiz Mellet, P. Compain, *ChemBioChem* **2013**, 14, 1-13.
- ³⁵ M. R. Duff, J. Grubbs, E. E. Howell, *JoVE* **2011**, 55, e2796.
- ³⁶ M. Meloun, Z. Ferencikova, *Fluid Phase Equilib.* **2012**, 328, 31-41.
- ³⁷ a) J.-Q. Fan, *Biol. Chem.* **2008**, 389, 1-11; b) J. M. Benito, J. M. García Fernández, C. Ortiz Mellet, *Exp. Opin. Ther. Patents* **2011**, 21, 885-903; c) G. Parenti, *EMBO Mol. Med.* **2009**, 1, 268-279; d) T. M. Wrodnigg, A. E. Stütz, *Curr. Enz. Inhib.* **2012**, 8, 47-99.

³⁸ C. Decroocq, D. Rodríguez-Lucena, K. Ikeda, N. Asano, P. Compain, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 661-664.

³⁹ P. Compain, C. Decroocq, A. Joosten, J. de Sousa, D. Rodríguez-Lucena, T. D. Butters, J. Bertrand, F. Becq, C. Norez, *ChemBioChem* **2013**, *14*, DOI: 10.1002/cbic.201300312.

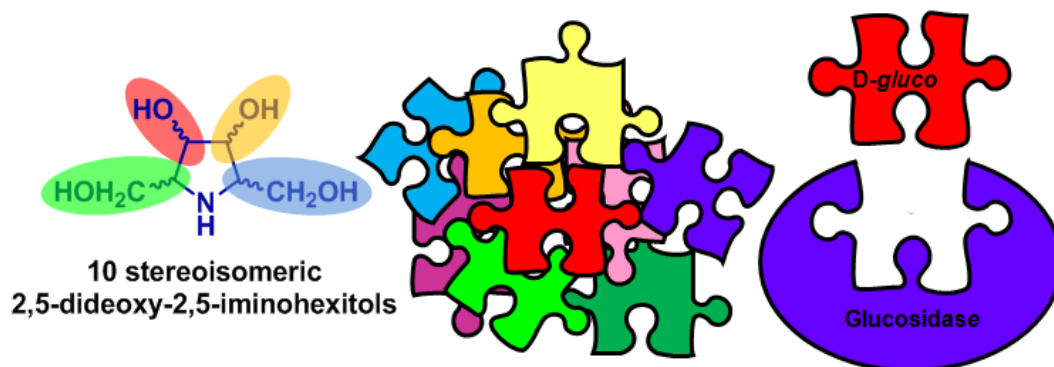
⁴⁰ a) F. Becq, M. A. Mall, D. N. Sheppard, M. Conese, O. Zegarra-Moran, *J. Cyst. Fibrosis* **2011**, *10*, S129-S145; b) S. Molinski, P. D. W. Eckford, S. Pasyk, S. Ahmadi, S. Chin, C. E. Bear, *Front. Pharmacol.* **2012**, *3*, 1-18.

⁴¹ a) T C. Norez, S. Noel, M. Wilke, M. Bijvelds, H. Jorna, P. Melin, H. DeJonge, F. Becq, *FEBS letters* **2006**, *580*, 2081-2086; b) S. Noel, C. Faveau, C. Norez, C. Rogier, Y. Mettey, F. Becq, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2006**, *319*, 349-359; c) C. Norez, F. Antigny, S. Noel, C. Vandebrouck, F. Becq, *Am. J. Resp. Cell. Mol. biol.* **2009**, *41*, 217-225.

Capítulo 7

Síntesis de pirrolidinas de configuración L-*ido*

Abstract. The enantiomers of glucuronolactone are excellent chirons for the synthesis of the 10 stereoisomeric 2,5-dideoxy-2,5-iminohexitols by formation of the pyrrolidine ring by nitrogen substitution at C2 and C5, with either retention or inversion of configuration; the stereochemistry at C3 may be adjusted during the synthesis to give seven stereoisomers from each enantiomer.



7. Pirrolidinas como inhibidores de glicosidasas.

Dentro de las pirrolidinas, podemos encontrar el iminoazúcar natural 2,5-didesoxi-2,5-imino-D-manitol (DMDP), descubierto en 1976 y el cual se comporta como un potente inhibidor de β -Glucosidasas y β -Galactosidasas.¹ En comparación, su enantiómero L-DMDP se comporta como un potente inhibidor de α -Glucosidasas, e incluso mucho más selectivo que el iminoazúcar natural.² En 2004, N. Asano *et al.*³ aislaron e identificaron una serie de pirrolidinas de fuentes naturales **205-207** (*Scilla Peruviana*) con el mismo perfil configuracional que la DMDP, aunque el grupo hidroximetilo de la posición C-2 se encontraba sustituido por cadenas alifáticas más complejas.

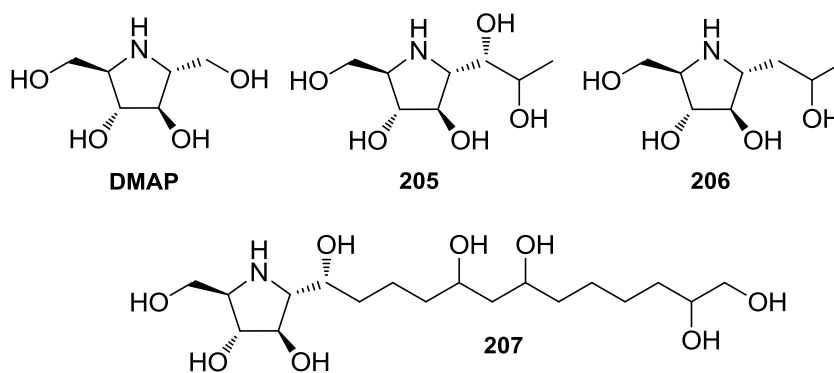


Figura 7.1. Iminoazúcares naturales con estructura de pirrolidina.

Las propiedades terapéuticas descritas para algunas de las pirrolidinas aisladas de fuentes naturales ha llevado a muchos autores a diseñar novedosas estrategias sintéticas con la finalidad de obtener nuevos glicomiméticos que presenten mayor selectividad y eficacia. D. Perrone *et al.*⁴ y N. Ikota⁵ describieron la síntesis de un isómero de la DMAP de configuración D-alo, la 2,5-dideoxy-2,5-imino-D-alitol (DADP), partiendo de la 2,3,5-tri-O-bencil-D-lixofuranosa o del ácido (S)-piroglutámico, respectivamente. De igual modo, el grupo del Prof. A. E. Stütz diseñó una ruta sintética, a partir de la D-

glucoronolactona, para preparar la 2,5-didesoxi-2,5-imino-D-altritol (DALDP)⁶ (Figura 7.2).

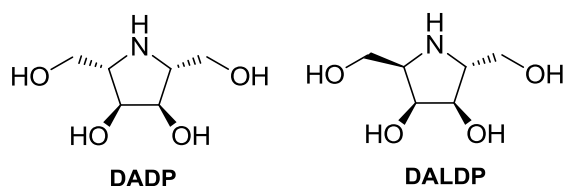


Figura 7.2. Estructuras de los derivados DADP y DALDP.

La D-glucuronolactona ha sido usada ampliamente como material de partida para la preparación de carbohidratos más complejos así como de iminoazúcares.⁷ Los enantiómeros de la glucuronolactona ofrecen una fuente excelente para la síntesis de todos los estereoisómeros 2,5-didesoxi-2,5-iminohexitoles por formación del anillo de pirrolidina mediante la sustitución del grupo hidroxilo por nitrógeno en la posición C-5 y posterior ciclación intramolecular por desplazamiento nucleófilo empleando un mesilato como grupo saliente en la posición C-2. En este terreno, el grupo de investigación del Prof. G. W. J. Fleet del Chemistry Research Laboratory de la Universidad de Oxford cuenta con una amplia experiencia. Estudios recientes de dicho grupo de investigación han demostrado la importancia de la estereoquímica en la potencia y selectividad de diferentes pirrolidinas como inhibidores de α o β -glicosidasas.⁸ El objetivo principal de este capítulo, realizado en el marco de una estancia breve en el laboratorio del Prof. Fleet, es la síntesis de todos los estereoisómeros 2,5-didesoxi-2,5-iminohexitoles a partir de la D- o L-glucuronolactona como material de partida con el fin de estudiar la influencia del perfil configuracional de los iminoazúcares en la inhibición de las glicosidasas. En la serie de las aldohexosas, podemos encontrar hasta un total de 8 configuraciones diferentes, tanto de la serie D como de la serie L (*alo*, *altro*, *galacto*, *gluco*, *gulo*, *ido*, *mano* y *talo*). En un principio se podría esperar hasta un total de 16 estereoisómeros 2,5-didesoxi-2,5-iminohexitoles, aunque la equivalencia entre algunos por simetría hace que podamos encontrar sólo 10 estereoisómeros diferentes (Figuras 7.3 y 7.4).

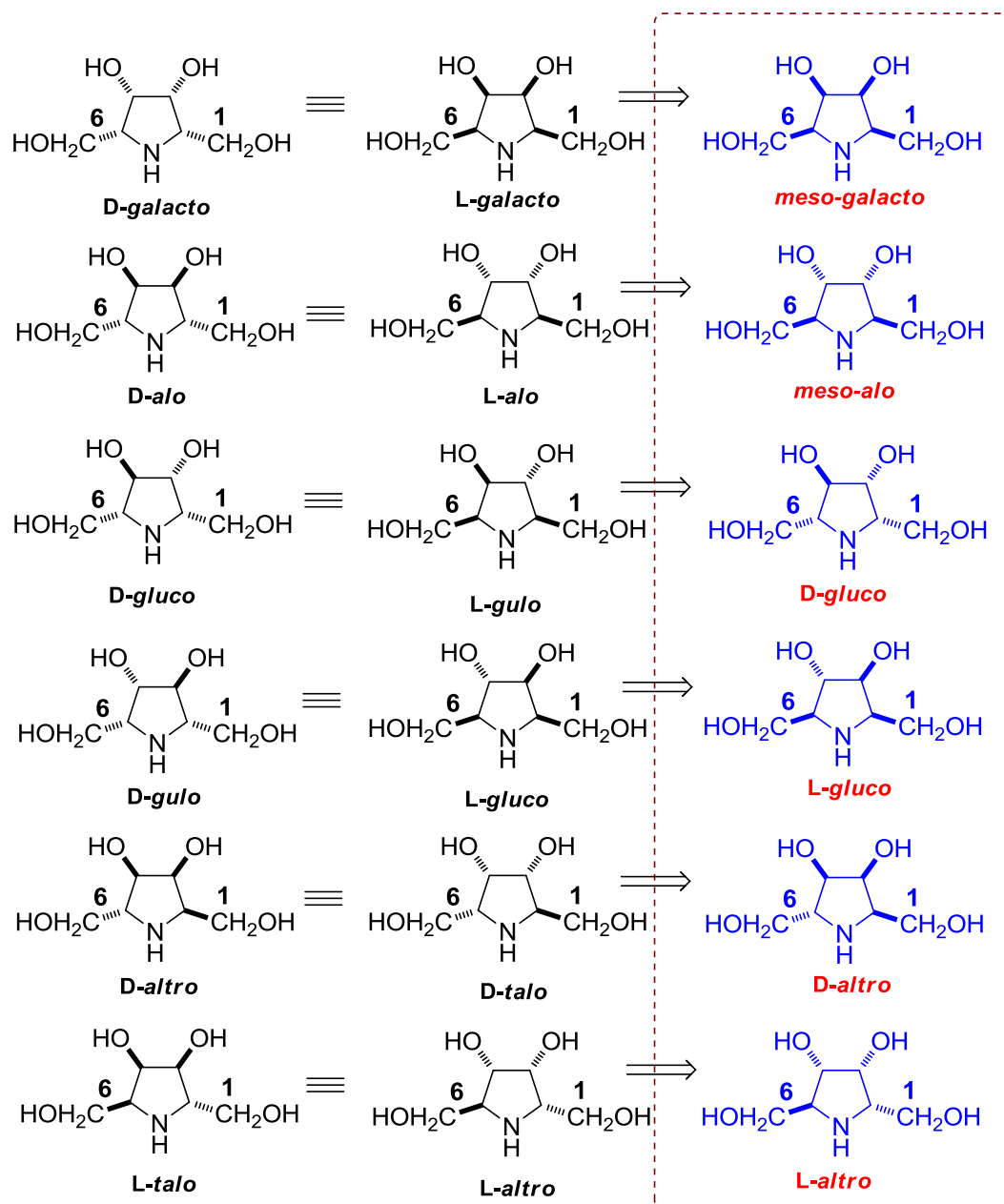


Figura 7.3. Estructura de las pirrolidinas de configuración D- y L-*gluco* y *altro* y de las dos formas *meso* (*galacto* y *alo*).

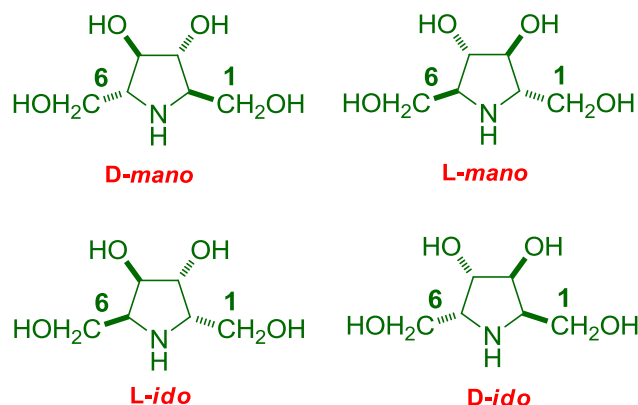


Figura 7.4. Estructura de las pirrolidinas de configuración D- y L-ido y *mano* que completan la serie de los 10 estereoisómeros 2,5-didesoxi-2,5-iminohexitoles diferentes.

La estrategia de síntesis seguida partiendo de la D- o L-glucuronolactona, combinando la inversión o retención de la configuración en las posiciones C-2, C-3 y C-5, hace posible la preparación de esos 10 estereoisómeros. Además, los intermedios de síntesis nos permiten acceder a un total de 16 estereoisómeros diferentes con función amida en la posición C-2 como derivados de la prolina, con el fin de estudiar la influencia de diferentes grupos funcionales en dicha posición en la inhibición de las glicosidasas (Figura 7.5).

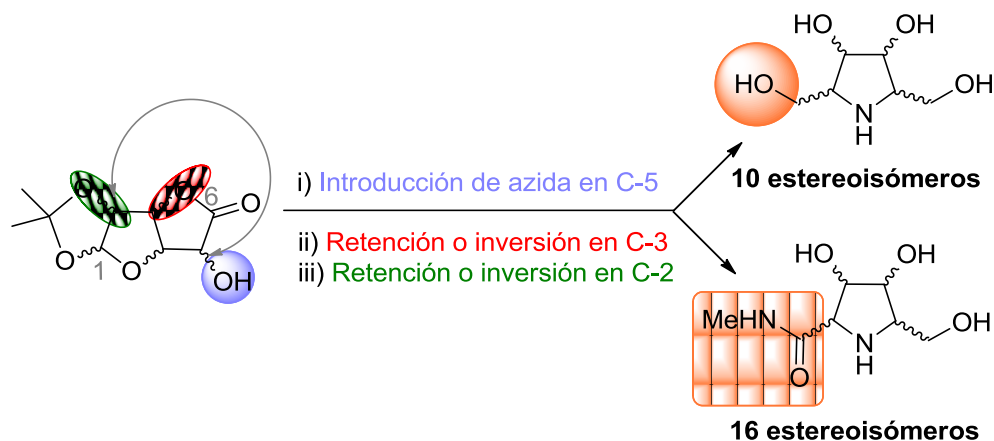


Figura 7.5. Estrategia de síntesis propuesta para la obtención de las pirrolidinas objetivos.

En concreto, se han sintetizado dos iminoazúcares con estructura de pirrolidina de configuración *L-ido*, funcionalizadas con un grupo hidroximetilo o *N*-metilamido en la posición C-2. Para ello se ha partido de la D-glucuronolactona como material de partida y se han llevado a cabo las inversiones/retenciones en las posiciones C-2, C-3 y C-5 mostradas en la Figura 7.6.

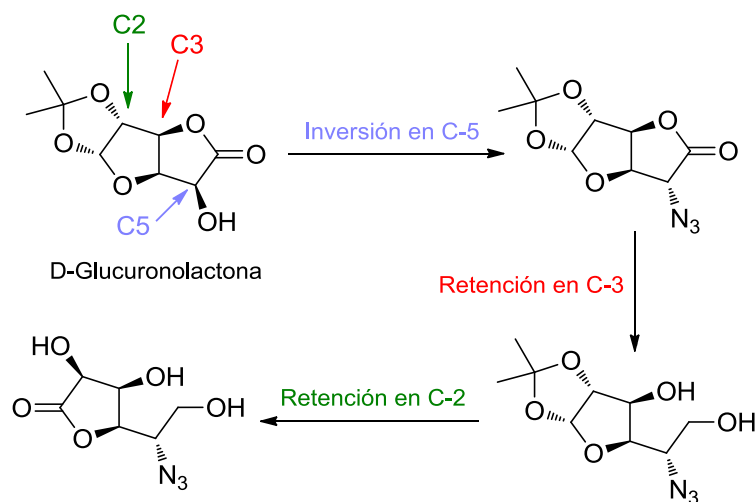
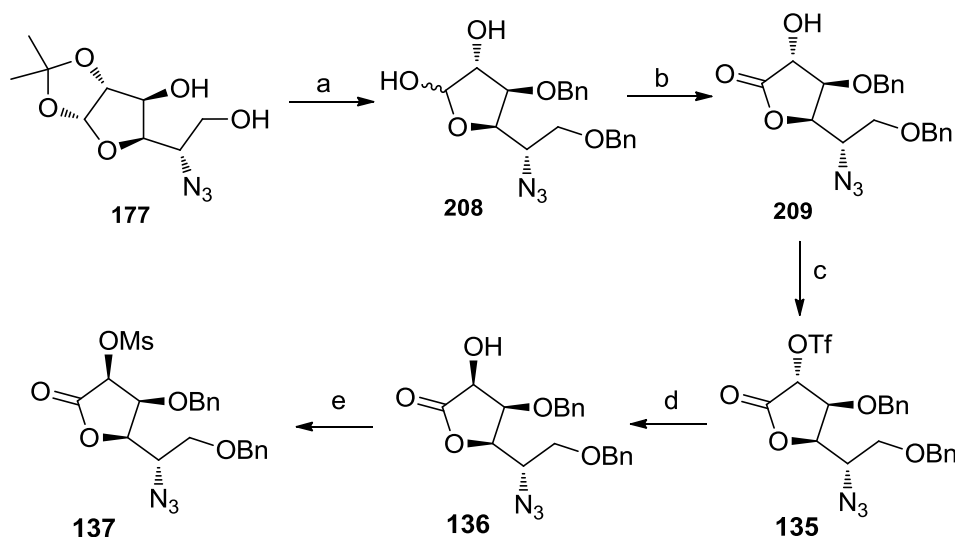


Figura 7.6. Estrategia sintética para la preparación de pirrolidinas de configuración *L-ido* a partir de la D-glucuronolactona.

7.1. Preparación de pirrolidinas derivadas de 2,5-didesoxi-2,5-L-iditol.

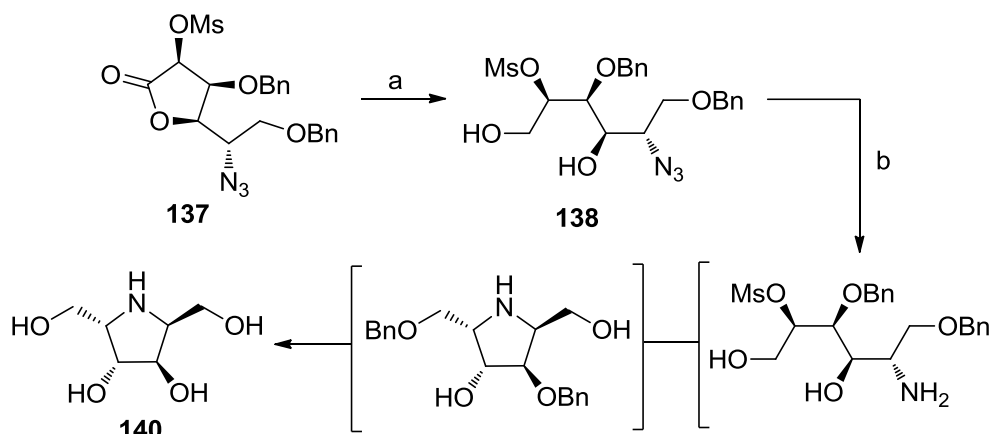
Para la preparación de las pirrolidinas de configuración *L-ido*, se llevó a cabo la preparación de 5-azido-5-desoxi-1,2-*O*-isopropiliden- α -L-idofuranosa **177** a partir de la D-glucuronolactona comercial siguiendo la estrategia sintética descrita previamente en la literatura.⁹ La bencilación de **177** con BnBr en DMF seguida de la hidrólisis del grupo isopropilidén en medio ácido empleando *p*-TSA generó el derivado **208** con excelentes rendimientos. La oxidación empleando yodo (\rightarrow **209**) seguida de triflación del hidroxilo de la posición C-2 condujo al derivado **135**. La inversión de la configuración en dicha posición usando trifluoroacetato sódico seguida de mesilación permitió aislar el mesilato intermedio **137**, el cual fue usado para obtener los derivados finales (Esquema 7.1).



Esquema 7.1. Preparación del derivado **137**. Reactivos y condiciones: a, 1. BnBr, NaH, DMF, 0 °C a t.a., 16 h, 95%; 2. *p*-TSA, dioxano-H₂O 7:1, 90 °C, 45 min, 86%; b, I₂, K₂CO₃, *t*-BuOH, 105 °C, 2 h, 70%; c, Tf₂O, py, CH₂Cl₂, -40 °C, 1 h, 84%; d, NaOCOCF₃, CH₂Cl₂, py, t.a., 4 h, 96 %; e, MsCl, py, 0 °C, 4 h, 96%.

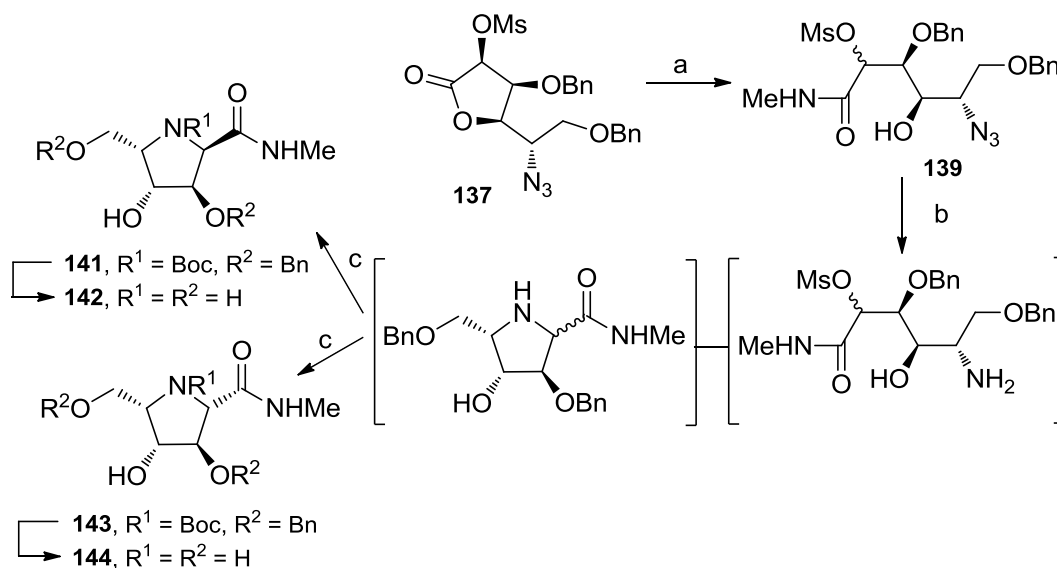
La reducción de la lactona de **137** con NaBH₄ (\rightarrow **138**) seguida de reducción del grupo azido en presencia de Pd/C y desbencilación en medio ácido dio lugar a la

pirrolidina 2,5-didesoxi-2,5-L-iditol **140** objetivo con elevado rendimiento (Esquema 7.2).



Esquema 7.2. Preparación del derivado **140**. Reactivos y condiciones: a, NaBH₄, EtOH, -30 °C, 1 h, 82%; b, 1. Pd/C, H₂, dioxano, NaOAc, t.a., 24 h; 2. HCl 2 M, t.a., 12 h, 92%.

Para la síntesis del derivado de prolina se partió del mesilato derivado **137**. La apertura del anillo de **137** usando metilamina condujo a una mezcla de epímeros en una proporción 1:1. Para separar ambas amidas, fue necesario la protección del grupo amino en forma de carbamato empleando Boc₂O. Finalmente, la desbencilación de los grupos hidroxilos en presencia de Pd/C seguida de la hidrólisis del grupo carbamato por acidificación con TFA nos proporcionó la pirrolidina deseada de configuración L-ido, así como el isómero de configuración L-gulo (Esquema 7.3).



Esquema 7.3. Preparación de los derivados **142** y **144**. Reactivos y condiciones: a, MeNH₂, dioxano, 16 h, t.a., 99%; b, 1. Pd/C, dioxano, NaOAc, t.a., 24 h; 2. Boc₂O, dioxano, t.a., 15 h, 74% global; c, Pd/C, H₂, dioxano, HCl 0.3 M, 24 h; 2. TFA/H₂O, 30 min, t.a.

¹ a) T. M. Wrodnigg, A. E. Stütz, C. A. Tarling, S. G. Withers, *Carbohydr. Res.* **2006**, 341, 1717-1722; b) T. M. Wrodnigg, S. G. Withers, A. E. Stütz, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, 11, 1063-1064.

² C.-Y. Yu, N. Asano, K. Ikeda, M. X. Wang, T. D. Butters, M. R. Wormald, R. A. Dwek, A. L. Winters, R. J. Nash, G. W. J. Fleet, *Chem. Commun.* **2004**, 1936-1937.

³ N. Asano, K. Ikeda, M. Kasahara, Y. Arai, H. Kizu, *J. Nat. Prod.* **2004**, 67, 846-850.

⁴ A. Dondoni, P. P. Giovannini, D. Perrone, *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 6203.

⁵ N. Ikota, *Tetrahedron Lett.* **1992**, 33, 2553-2556.

⁶ M. H. Fechter, A. E. Stütz, *Carbohydr. Res.* **1999**, 319, 55-62.

⁷ a) A. P. Rauter, J. Figueiredo, M. Ismael, T. Canda, J. Font, M. Figueredo, *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, 12, 1131-1146; b) E. D. Goddard-Borger, E. L. Ghisalberti, R. V. Stick, *Eur. J. Org. Chem.* **2007**, 3925-3934; c) D. Matsuura, T. Mitsui, T. Sengoku, M.

Takahashi, H. Yoda, *Tetrahedron* **2008**, *64*, 11686-11696; d) D. D. Xu, L. Waykole, J. V. Calienni, L. Ciszewski, G. T. Lee, W. Liu, J. Szewczyk, K. Vargas, K. Prasad, O. Repic, T. J. Blacklock, *Org. Process Res. Dev.* **2003**, *7*, 856-865; e) N. B. Kalamkar, V. M. Kasture, S. T. Chavan, S. G. Sabharwal, D. D. Dhavale, *Tetrahedron* **2010**, *66*, 8522-8526.

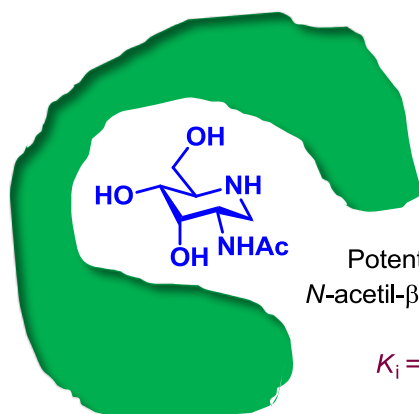
⁸ D. Best, C. Wang, A. C. Weymouth-Wilson, R. A. Clarkson, F. X. Wilson, R. J. Nash, S. Miyauchi, A. Kato, G. W. J. Fleet, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2010**, *21*, 311-319.

⁹ K. Dax, B. Gaigg, V. Grassberger, B. Kölblinger, A. E. Stütz, *J. Carbohydr. Chem.* **1990**, *9*, 479-499.

Capítulo 8

Síntesis de DAJNAc como Inhibidor de Hexosaminidasas

Abstract: A practical synthesis of the previously unreported *N*-acetyl-D-allosamine glycomimetic DAJNAc is described. The reaction sequence involves Pd-catalyzed allylic substitution by phthalimide in an azaheterobicyclic scaffold as the key step. The new iminosugar resulted in being a stronger β -*N*-acetylglucosaminidase (human placenta) competitive inhibitor than the *D*-*gluco* (DNJNAc) and *D*-*galacto* (DGJNAc) stereoisomers.



Potente inhibidor de
N-acetil- β -glucosaminidasa

$$K_i = 2.6\text{-}5.7 \mu\text{M}$$

8. Síntesis y evaluación biológica de la 2-acetamido-1,2-didesoxialonojirimicina (DAJNAc) como inhibidor de hexosaminidasas.

Entre los iminoazúcares, los análogos de *N*-acetilhexosaminas se comportan en general como buenos inhibidores de hexosaminidasas y tienen un potencial importante para el tratamiento de la osteoartritis,¹ alergia,² Alzheimer³ o los síndromes de Sandhoff, Tay-Sachs y Schindler-Kanzaki.⁴ Por ejemplo, la 2-acetamido-1,2-didesoxi-D-nojirimicina (DNJNAc, Figura 1) y algunos de sus derivados son inhibidores potentes de β -hexosaminidasas^{5, 6} y de β -*O*-(*N*-acetil)glucosaminidasa (*O*-GlcNAcase).⁷ Los compuestos análogos de configuración D-*galacto*, como la 2-acetamido-1,2-didesoxi-D-galactonojirimicina (DGJNAc) y sus *N*-alquil derivados, son inhibidores potentes de α -galactosaminidasas (α -GalNAcase) y β -hexosaminidasas,^{8, 9} mientras que la 2-acetamido-1,2-didesoxi-D-manorijirimicina (DMJNAc) y sus derivados son inhibidores potentes de la UDP-*N*-acetilglucosamina 2-epimerasa.¹⁰ Dada la importancia de la actividad biológica de los análogos de *N*-acetilhexosamina, y dentro de la línea de investigación dirigida al desarrollo de inhibidores selectivos de glicosidasas como candidatos a fármacos,¹¹ en colaboración con el grupo de A. Riera de la Universidad de Barcelona nos planteamos completar esta serie de derivados con la preparación y evaluación de la capacidad inhibitoria frente a glicosidasas del análogo de configuración D-*alo*, la 2-acetamido-1,2-didesoxi-D-alonojirimicina (DAJNAc).

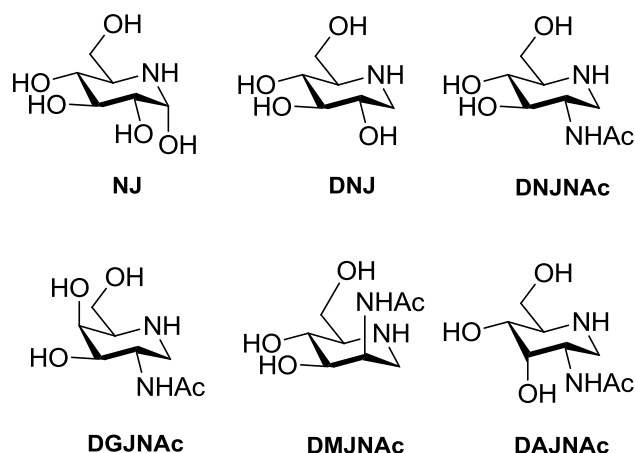
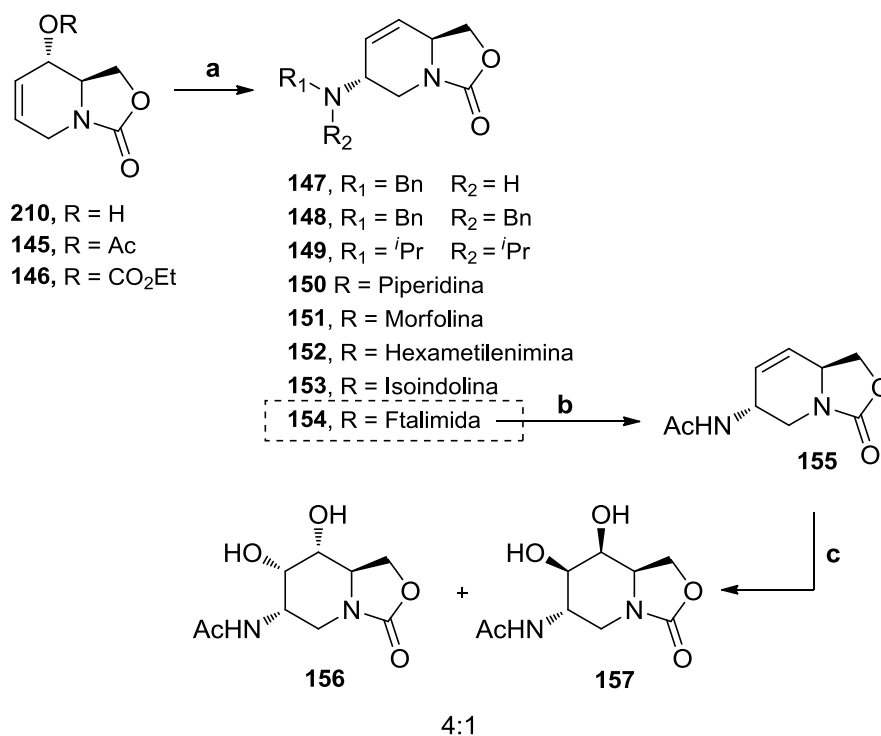


Figura 8.1. Estructuras de la nojirimicina (NJ), de su derivado 1-desoxi (DNJ), y de los análogos diastereoisoméricos 2-acetamido-1,2-didesoxi iminoazúcares con configuración *D-gluco*- (DNJNAc), *D-galacto*- (DGJNAc), *D-mano*- (DMJNAc) y *D-allo*- (DAJNAc).

La mayoría de los procedimientos de síntesis de iminoazúcares utilizan una fuente de quiralidad de origen natural (“chiral pool”), partiendo de carbohidratos, aminoácidos o ácido tartárico como sustratos de partida.¹² Sin embargo, la elevada densidad de grupos funcionales de estos compuestos y la dificultad para introducir un grupo acetamido en el segmento C2—C3—C4 con todos los sustituyentes en disposición relativa *cis*, característico de los derivados de configuración *D-allo*, convierte la preparación de DAJNAc en un objetivo interesante desde el punto de vista sintético. Como intermedio clave de la síntesis consideramos el precursor bicíclico **210**, que se obtiene haciendo uso de la epoxidación de Sharpless a partir del penta-1,4-dien-3-ol con una elevada pureza enantiomérica.¹³



Esquema 8.1. Preparación de los *N*-acetamidodiolcarbamatos **156** (D-*alo*) y **157** (D-*galacto*). Reactivos y condiciones: a, [Pd(μ^3 -C₃H₅)Cl]₂, dppe, nucleófilo, THF, t.a.; b, 1. N₂H₄, EtOH, reflujo, 2. Ac₂O, py, 98%; c, K₂Os₂O₄·2H₂O, NMO, acetona-agua, 66%.

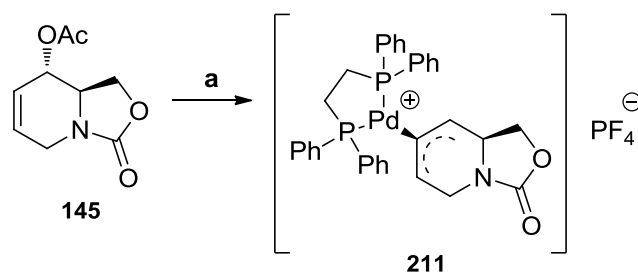
La acetilación de **210** con anhídrido acético/Et₃N/DMAP condujo a **145** con un 98% de rendimiento (Esquema 8.1). La introducción del grupo amino mediante sustitución alílica catalizada por Pd,¹⁴ resultó, sin embargo, problemática. Los ensayos utilizando el anión azida o aminas primarias o secundarias como nucleófilos y bis(alil)paladio cloruro/1,2-bis(difenilfosfino)etano (dppe) como catalizador resultaron infructuosos (Tabla 8.1, entradas 1-3). Sólo las aminas secundarias cíclicas dieron lugar a los productos de adición **150-153** con rendimientos satisfactorios (Tabla 8.1, entradas 3-7). En estos casos, se observó un único producto con un control completo de la regio- y diastereoselectividad. El análisis mediante experimentos NOESY de los productos **150-**

152 indicó que la reacción transcurre a través de un ataque *syn* en la posición C-5, la menos impedida, del anillo de piperidina (C-2 en la nomenclatura de iminoazúcar). La diastereoselectividad observada apunta a una complejación del átomo de Pd por la cara opuesta a la del grupo acetoxi saliente. Esta hipótesis quedó confirmada mediante la preparación del complejo **211**, con un 84% de rendimiento, por tratamiento de **145** con una cantidad equimolar del catalizador, seguido de precipitación con hexafluorofosfato amónico (Esquema 8.2). De acuerdo con lo esperado, sólo se observó un diasteroisómero cuya estereoquímica se estableció mediante experimentos NOESY.

Tabla 8.1. Rendimientos aislados de los productos de adición de nucleófilos nitrogenados a los ésteres **145** y **146** catalizada por Pd.^a

Entrada	Sustrato	Nucleófilo	Producto	Rend. %
1	145	Butilamina	147	0
2	145	Dibencilamina	148	0
3	145	Diisopropilamina	149	0
4	145	Piperidina	150	88
5	145	Morfolina	151	91
6	145	Hexametenimina	152	88
7	145	Isoindolina	153	74
8	145	Ftalimida	154	25
9	145	Ftalimida de cesio	154	48
10	146	Ftalimida de cesio	154	75

^a Las reacciones se llevaron a cabo en DME (1,2-dimetoxietano) a 85 °C.



Esquema 8.2. Preparación del complejo estable de Pd-alilo **211**. Reactivos y condiciones: a, $[\text{Pd}(\mu^3\text{-C}_3\text{H}_5)\text{Cl}]_2$, NH_4PF_6 , EtOH, 85%.

Aunque el procedimiento anterior resulta adecuado para la síntesis de iminoazúcares análogos de hexosamina, ninguna de las aminas **148-154** permitieron introducir el grupo acetamido del análogo de *N*-acetilalosamina objetivo DAJNAc. El uso de ftalimida como nucleófilo condujo, con un 25% de rendimiento, al derivado **154** que es un precursor potencial de DAJNAc (Esquema 8.1; Tabla 8.1, entrada 8). El empleo de las condiciones desarrolladas por Trost,¹⁵ que implican la generación de la sal sódica en DME, permitió preparar **154** con un 48% de rendimiento. La sustitución del acetato **145** por el carbonato **146**, preparado a partir de **210** con un 90% de rendimiento por tratamiento con cloroformiato de etilo/piridina, permitió aumentar el rendimiento del producto de adición **154** (entrada 10) hasta un 75%. El grupo ftalimido se desprotegió por tratamiento con hidracina en EtOH a reflujo, originando la correspondiente amina primaria que se acetiló para dar la acetamida **155** con un 98% de rendimiento global para las dos etapas. La dihidroxilación de **155** usando NMO (*N*-óxido de la *N*-metilmorfolina) y cantidades catalíticas de $\text{K}_2\text{OsO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en acetona/ H_2O condujo a una mezcla 4:1 de las acetamidas **156** (*D*-*alo*) y **157** (*D*-*galacto*) con un 66% de rendimiento. Las condiciones de “dihidroxilación asimétrica de Sharpless” no mejoraron ni el rendimiento ni la relación de los diastereoisómeros. Afortunadamente, los dos isómeros se comportaron como sólidos cristalinos fácilmente separables por cromatografía y sus configuraciones se determinaron inequívocamente mediante difracción de rayos X (Figura 8.2).

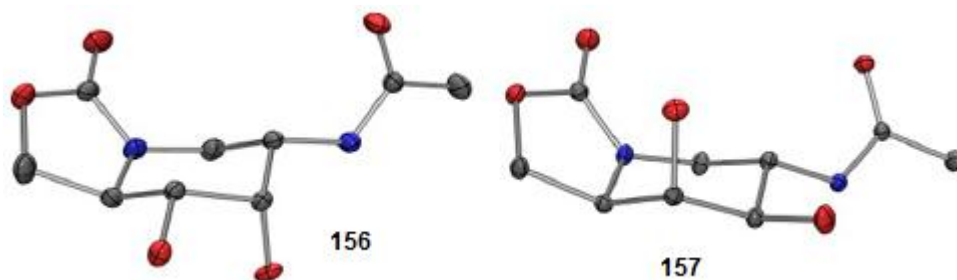
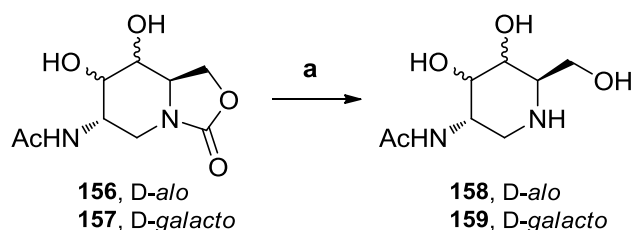


Figura 8.2. Estructuras cristalinas de los *N*-acetamidodiolcarbamatos **156** (D-*alo*) y **157** (D-*galacto*).

La hidrólisis del anillo de 2-oxazolidinona de **156** y **157** por tratamiento con NaOH 6 M a reflujo permitió aislar la DAJNAc **158** y el isómero DGJNAc **159** con rendimientos del 40% y del 38%, respectivamente (Esquema 8.3).¹⁶



Esquema 8.3. Síntesis de DAJNAc **158** y DGJNAc **159**. Reactivos y condiciones: a, NaOH 6 M, reflujo, 38-40%.

En la Tabla 8.2 se incluyen los valores de las constantes de inhibición (K_i) de la DAJNAc, DNJNAc y DGJNAc frente a un panel de glicosidasas comerciales incluyendo tres β -*N*-acetilglucosaminidasas (placenta humana, riñón de buey y judía Jack). El derivado DAJNAc se comportó como un inhibidor modesto de la β -*Manasa* (K_i 150 μ M) y presentó una elevada selectividad hacia las β -*N*-acetilglucosaminidasas (Figura 8.3 y 8.4). Los valores del compuesto DAJNAc se encuentran en el mismo rango que los observados para DNJNAc y DGJNAc (5.6-2.6 μ M) y, de hecho, la capacidad de inhibición frente a la enzima de placenta humana fue 1.3-1.5-veces mayor que la del

iminoazúcar de configuración D-*gluco*. En la Figura 8.5 se indican las estructuras de los inhibidores más potentes descritos frente a las tres enzimas evaluadas **212**,¹⁷ **213**,¹⁸ y **214**,¹⁹ y los valores correspondientes de K_i o IC_{50} . Los datos obtenidos indican que los cambios configuracionales en los centros C-3 y C-4 no afectan a la afinidad hacia la β -N-acetilglucosaminidasa y, por otra parte, la eficacia de la estrategia sintética desarrollada garantiza su utilidad para el desarrollo de estrategias orientadas a incrementar la diversidad molecular en futuras aproximaciones.

Tabla 8.2. Constantes de inhibición (K_i , μ M) frente a N-acetil- β -glucosaminidasas de DAJNAc y sus epímeros de configuración D-*gluco*- (DNJNAc) y D-*galacto* (DGJNAc).^a

N-acetil- β -glucosaminidasas ^b	DNJNAc ⁹	DGJNAc ⁹	DAJNAc
Placenta humana	7.0 ± 0.2	8.3 ± 0.3	5.6 ± 0.1
Riñón de buey	7.4 ± 0.3	4.2 ± 0.1	2.6 ± 0.1
Judía Jack	2.9 ± 0.1	1.8 ± 0.1	2.6 ± 0.1

^aNo se observó inhibición frente a α -Glcasa (levadura), isomaltosa (levadura), amiloglucosidasa (*Aspergillus niger*), β -Glcasa (almendra y de hígado de buey), α -Galasa (grano de café), β -Galasa (*E. Coli*), α -Manasa (judía Jack), β -Manasa (*Helix pomatia*) (excepto para DAJNAc; K_i 150 μ M), naringinasa (*Penicillium decumbens*). ^bEl modo de inhibición fue competitivo para DAJNAc frente a β -N-acetilglucosaminidasa de placenta humana y no competitivo frente a las enzimas de riñón de buey y judía Jack.

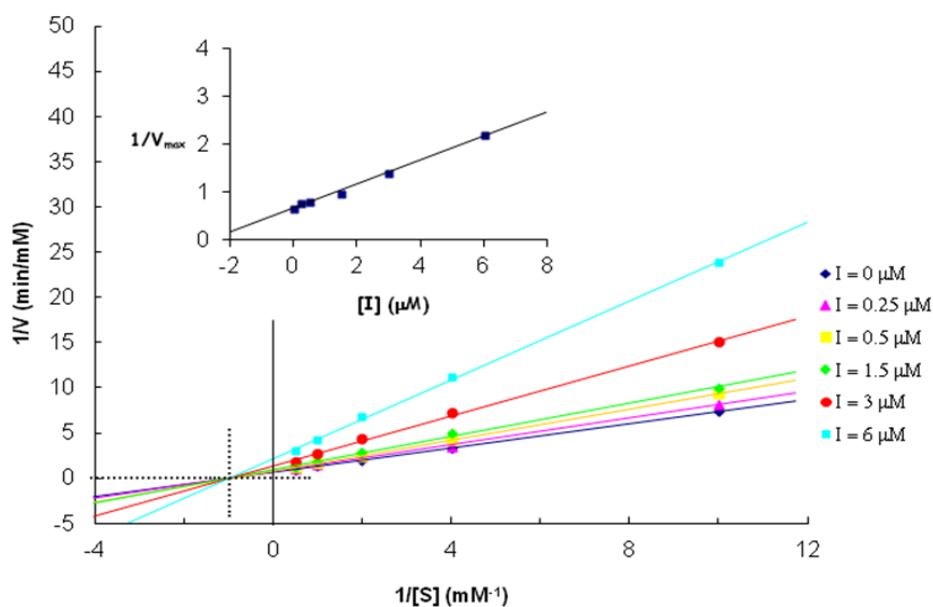


Figura 8.3. Representación de tipo Lineweaver-Burk Plot para la determinación del valor de K_i (2.6 μ M) de DAJNAc frente a la *N*-acetil- β -glucosaminidasas (riñón de buey; pH 5.5).

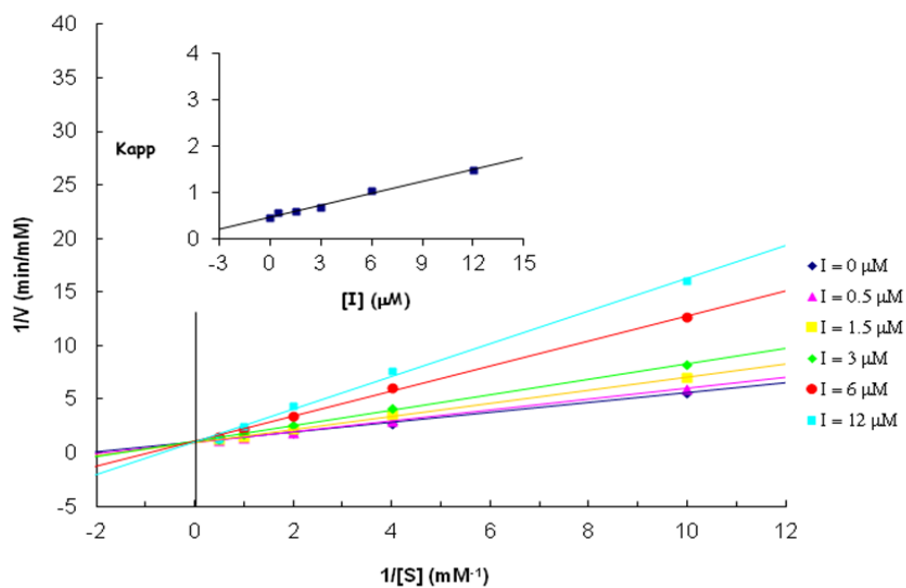


Figura 8.4. Representación de tipo Lineweaver-Burk Plot para la determinación del valor de K_i (5.6 μ M) de DAJNAc frente a la *N*-acetil- β -glucosaminidasas (placenta humana; pH 5.5).

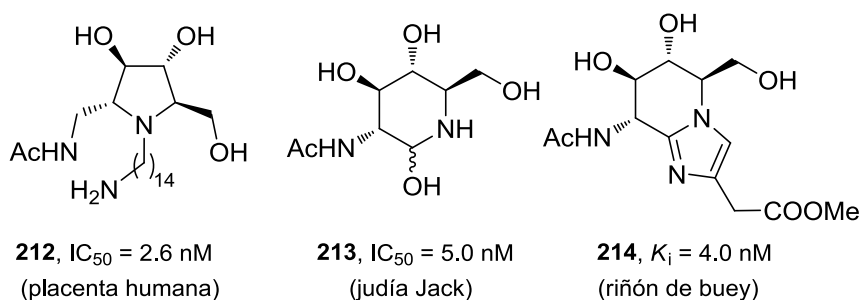


Figura 8.5. Estructuras de la pirrolidina **212**, 2-acetamido-2-desoxinoxirimicina **213** y nagstatina **214**, los inhibidores más potentes de la β -N-acetilglucosaminidasa de placenta humana, judía Jack beans y riñón de buey, respectivamente.

En este capítulo se describe una nueva metodología de síntesis para acceder a iminoazúcares miméticos de 2-acetamido-1,2didesoxiazúcares como inhibidores de hexosaminidasas y su aplicación a la síntesis de la 2-acetamido-1,2-didesoxialonojirimicina (DAJNAc).

¹ J. Liu, M. M. D. Numa, H. Liu, S. Huang, P. Sears, A. R. Shikhman, C. Wong, C. J. *Org. Chem.* **2004**, 69, 6273-6283.

² T. A. Reese, H. Liang, A. M. Tager, A. D. Luster, R. Van Nico, D. Voehringer, R. M. Locksley, *Nature* **2007**, 447, 92-96.

³ F. Liu, K. Iqbal, I. Grundke-Iqbal, G. W. Hart, C. Gong, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2004**, 101, 10804-10809.

⁴ a) M. B. Tropak, J. E. Blanchard, S. G. Withers, E. D. Brown, D. Mahuran, *Chem. Biol.* **2007**, 14, 153-164; b) I. B. Tomasic, M. C. Metcalf, A. I. Guce, N. E. Clark, S. C. Garman, *J. Biol. Chem.* **2010**, 285, 21560-21566; c) N. E. Clark, M. C. Metcalf, D. Best, G. W. J. Fleet, S. C. Garman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2012**, 109, 17400-17405.

⁵ a) G. W. J. Fleet, L. E. Fellows, P. W. Smith, *Tetrahedron* **1987**, 43, 979-90; b) G. W. J. Fleet, P. W. Smith, R. J. Nash, L. E. Fellows, R. B. Parekh, T. W. Rademacher, *Chem.*

Lett. **1986**, 1051-1054; c) G. Gradnig, G. Legler, A. E. Stütz, *Carbohydr. Res.* **1996**, 287, 49-57.

⁶ A. J. Steiner, G. Schitter, A. E. Stütz, T. M. Wrodnigg, C. A. Tarling, S. G. Withers, D. J. Mahuran, M. B. Tropak, *Tetrahedron: Asymmetry* **2009**, 20, 832-835.

⁷ a) L. Wells, K. Vosseller, G. W. Hart, *Science* **2001**, 291, 2376-2378; b) J. A. Hanover, *FASEB J.* **2001**, 15, 1865-1876.

⁸ a) D. Best, P. Chairatana, A. F. G. Glawar, E. Crabtree, T. D. Butters, F. X. Wilson, C. Yu, W. Wang, Y. Jia, I. Adachi, A. Kato, G. W. J. Fleet, *Tetrahedron Lett.* **2010**, 51, 2222-2224; b) A. M. Schueller, F. R. Heiker, *Carbohydr. Res.* **1990**, 203, 308-13; c) S. H. Kang, D. H. Ryu, *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 607-610.

⁹ A. F. G. Glawar, D. Best, B. J. Ayers, S. Miyauchi, S. Nakagawa, M. Aguilar-Moncayo, J. M. García Fernández, C. Ortiz Mellet, E. V. Crabtree, T. D. Butters, F. X. Wilson, A. Kato, G. W. J. Fleet, *Chem.; Eur. J.* **2012**, 18, 9341-9359.

¹⁰ a) S. Al-Rawi, S. Hinderlich, W. Reutter, A. Giannis, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, 43, 4366-4370; b) T. Kajimoto, K. K. C. Liu, R. L. Pederson, Z. Zhong, Y. Ichikawa, J. A. Jr Porco, C.-H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 6187-96.

¹¹ a) Z. Luan, K. Higaki, M. Aguilar-Moncayo, H. Ninomiya, K. Ohno, M. I. García-Moreno, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, Y. Suzuki, *ChemBioChem* **2009**, 10, 2780-2782; b) Z. Luan, K. Higaki, M. Aguilar-Moncayo, L. Li, H. Ninomiya, E. Nanba, K. Ohno, M. I. García-Moreno, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, Y. Suzuki, *ChemBioChem* **2010**, 11, 2453-2464; c) E. M. Sánchez-Fernández, R. Rísquez-Cuadro, M. Chasseraud, A. Ahidouch, C. Ortiz Mellet, H. Ouadid-Ahidouch, J. M. García Fernández, *Chem. Commun.* **2010**, 46, 5328-5330; d) M. Aguilar-Moncayo, T. Takai, K. Higaki, T. Mena-Barragán, Y. Hirano, K. Yura, L. Li, Y. Yu, H. Ninomiya, M. I. García-Moreno, S. Ishii, Y. Sakakibara, K. Ohno, E. Nanba, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, Y. Suzuki, *Chem. Commun.* **2012**, 48, 6514-6516; e) J. Castilla, R. Rísquez, D. Cruz, K. Higaki, E. Namba, K. Ohno, Y. Suzuki, Y. Díaz, C. Ortiz Mellet, J. M.

García Fernández, S. Castellón, *J. Med. Chem.* **2012**, 58, 6857-6865; f) T. Takai, K. Higaki, M. Aguilar-Moncayo, T. Mena-Barragán, Y. Hirano, K. Yura, L. Yu, H. Ninomiya, M. I. García-Moreno, Y. Sakakibara, K. Ohno, E. Nanba, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, Y. Suzuki, *Mol. Ther.* **2013**, 21, 526-532; g) G. Tiscornia, E. L. Vivas, L. Matalonga, I. Berniakovich, M. Barragán Monasterio, C. Eguizábal, L. Gort, F. González, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, A. Ribes, A. Veiga, J. C. Izpisua Belmonte, *Hum. Mol. Genet.* **2013**, 22, 633-645; h) P. Alfonso, V. Andreu, A. Pino-Angeles, A. A. Moya-García, M. I. García-Moreno, J. C. Rodríguez-Rey, F. Sánchez-Jiménez, M. Pocoví, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, P. Giraldo, *ChemBioChem* **2013**, 14, 943-949.

¹² a) I. Dragutan, V. Dragutan, A. Demonceau, A. *RSC Adv.* **2012**, 2, 719-736; b) M. S. M. Pearson, M. Mathe-Allainmat, V. Fargeas, J. Lebreton, *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 2159-2191; c) K. Afarinkia, A. Bahar, *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, 16, 1239-1287.

¹³ a) R. Martín, A. Moyano, M. A. Pericas, A. Riera, A. *Org. Lett.* **2000**, 2, 93-95; b) R. Martín, C. Murruzzu, M. A. Pericas, A. Riera, *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 2325-2328.

¹⁴ a) B. M. Trost, M. L. Crawley, *Chem. Rev.* **2003**, 103, 2921-2943; b) M. Johannsen, K. A. Jorgensen, *Chem. Rev.* **1998**, 98, 1689-1708.

¹⁵ B. M. Trost, C. B. Lee, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, 123, 3687-3696.

¹⁶ A. de la Fuente, R. Martín, T. Mena-Barragán, X. Verdaguer, J. M. García Fernández, C. Ortiz Mellet, A. Riera, *Organic Letters* **2013**, 15, 3638-3641.

¹⁷ P.-H. Liang, W.-C. Cheng, Y.-L. Lee, H.-P. Yu, Y.-T. Wu, Y.-L. Lin, C.-H. Wong, *ChemBioChem* **2006**, 7, 165-173.

¹⁸ M. B. Tropak, S. P. Reid, M. Guiral, S. G. Withers, D. Mahuran, *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 13478-13487.

¹⁹ M. Terinek, A. Vasella, A. *Helv. Chim. Acta* **2005**, 88, 10-22.

Capítulo 9

Conclusiones

9. Conclusiones.

El conjunto de resultados obtenidos en esta Tesis permite extraer las siguientes conclusiones:

PRIMERA. La variabilidad estructural que permite la estrategia de preparación de los iminoazúcares sp^2 , tanto en lo que se refiere a modificaciones en el perfil configuracional y la naturaleza del esqueleto heterocíclico como al número, tipo y orientación de sustituyentes aglicónicos, unido a su estabilidad química y su elevada especificidad de acción, nos ha permitido identificar excelentes candidatos como chaperonas farmacológicas para varias LSDs, incluyendo Gaucher, Fabry y gangliosidosis GM_1 .

SEGUNDA. Estudios estructurales de los complejos chaperona-enzima mediante difracción de rayos X y datos de estructura-actividad confirman la importancia de las interacciones no glicónicas en la afinidad y selectividad de los iminoazúcares sp^2 frente a las glicosidasas lisosomales.

TERCERA. La evaluación del perfil de actividad frente a diferentes mutaciones asociadas a LSDs y estudios in vivo han permitido identificar chaperonas farmacológicas activas en variantes neuronopáticas y capaces de atravesar la barrera hematoencefálica. Esto, unido al coste sintético relativamente bajo de las metodologías desarrolladas, les convierte en buenos candidatos para su preparación en gran escala y la realización de ensayos preclínicos.

1. *Tuning glycosidase inhibition through aglycone interactions: Pharmacological Chaperones for Fabry disease and GM_1 gangliosidosis.* M. Aguilar-Moncayo, T. Takai, K. Higaki, T. Mena-Barragán, Y. Hirano, K. Yura, L. Li, Y. Yu, H. Ninomiya, M. I. García-Moreno, S. Ishii, Y. Sakakibara, K. Ohno, E. Nanba, C.

- Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, Y. Suzuki, *Chem. Commun.* **2012**, 48, 6514-6516.
2. *A bicyclic 1-deoxygalactonojirimycin derivative as a novel pharmacological chaperone for GM₁ gangliosidosis.* T. Takai, K. Higaki, M. Aguilar-Moncayo, T. Mena-Barragán, Y. Hirano, K. Yura, L. Yu, H. Ninomiya, M. I. García-Moreno, Y. Sakakibara, K. Ohno, E. Nanba, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, Y. Suzuki, *Mol. Ther.* **2013**, 21, 526-532.

CUARTA. La incorporación de un grupo funcional ortoéster como elemento sensible al pH en la estructura de iminoazúcares sp² ha demostrado ser una estrategia válida para acceder a chaperonas farmacológicas con la capacidad de modificar la afinidad por la enzima diana según que ésta se localice en el retículo endoplasmático (alta afinidad) o en el lisosoma (baja afinidad), favoreciendo así el procesamiento del sustrato correspondiente. Estudios preliminares en fibroblastos humanos de pacientes de GD demuestran la validez de la aproximación.

QUINTA. La reacción de cicloadición 1,3-dipolar entre azidas y alquinos catalizada por cobre(I) ha permitido acceder a multiconjugados de DNJ o DMJ utilizando el fullereno-[C₆₀] o la βCD como plataforma. El estudio de las propiedades inhibitorias frente a varias glicosidasas, mediante métodos cinéticos y termodinámicos, ha puesto de manifiesto la existencia de un efecto inhibitor multivalente especialmente significativo en el caso de la α-manosidasa de judía Jack, una enzima estructuralmente relacionada con las α-manosidasas lisosomal y de Golgi humanas. Este efecto es sensible a la valencia, distribución y orientación de los motivos de iminoazúcar, compartiendo rasgos similares a los que se encuentran en las interacciones entre glicoconjugados multivalentes y lectinas.

3. *Dramatic Effect of Multivalency on Glycosidase Inhibition with Fullerene Iminosugar Balls.* P. Compain, C. Decroocq, J. Iehl, M. Holler, D. Hazelard, T.

- Mena Barragán, C. Ortiz Mellet, J.-F. Nierengarten, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 5889-5892; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 5753-5756.
4. *The Multivalent Effect in Glycosidase Inhibition: Probing the Influence of Architectural Parameters with Cyclodextrin-based Iminosugar Click Clusters.* C. Decroocq, D. Rodríguez-Lucena, V. Russo, T. Mena Barragán, C. Ortiz Mellet, P. Compain, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 13825-13831.
 5. *The Multivalent Effect in Glycosidase Inhibition: Probing the Influence of Valency, Peripheral Ligand Structure and Topology with Cyclodextrin-based Iminosugar Click Clusters.* C. Decroocq, A. Joosten, R. Sergent, T. Mena Barragán, C. Ortiz Mellet, P. Compain, *ChemBioChem* **2013**, *14*, 1-13.

SEXTA. En el marco de una estancia de tres meses en el laboratorio del Prof. George, W. J. Fleet (Univ. Oxford), se han puesto a punto nuevos métodos de síntesis de iminoazúcares de la familia de las pirrolidinas con perfiles de configuración correspondientes a la serie L. Trabajos recientes han demostrado que este tipo de glicomiméticos, relacionados con el enantiómero del sustrato natural, pueden actuar como inhibidores específicos de glicosidasas.

SÉPTIMA. En colaboración con el Prof. Antoni Riera (Univ. de Barcelona), y con el objetivo de desarrollar nuevos inhibidores de hexosaminidasas, se ha llevado a cabo la primera síntesis de DAJNAc a partir de precursores no glicosídicos. Este compuesto se comportó como un potente inhibidor de varias β -N-acetilglucosaminidasas, siendo especialmente efectivo frente a la enzima humana aislada de placenta.

6. *Stereoselective Synthesis of 2-Acetamido-1,2-dideoxyallonojirimycin (DAJNAc), a New Potent Hexosaminidase Inhibitor.* A. de la Fuente, R. Martín, T. Mena-Barragán, X. Verdaguer, J. M. García Fernández, C. Ortiz Mellet, A. Riera, *Org. Lett.* **2013**, *15*, 3638-3641.

9. Conclusions.

In summary, the ensemble of results obtained within this Thesis leads to the following conclusions:

FIRST. The sp^2 -iminosugars strategy allows a great range of molecular diversity in terms of configurational profile, nature of the heterocyclic skeleton and number, type and spatial orientation of non-glycone substituents. This, together to their high chemical stability and glycosidase specificity let select good candidates as pharmacological chaperones for the treatment of several LSDs, including Gaucher, Fabry and GM_1 gangliosidosis diseases.

SECOND. X-ray diffraction studies on chaperone-glycosidase complexes and structure-activity relationship data confirm the importance of non-glycone interactions in the potency and selectivity of sp^2 -iminosugars against lysosomal glycosidases.

THIRD. LSD-associated mutation profile evaluation of selected iminosugar candidates and in vivo studies were conducted in order to identify pharmacological chaperones active on neuropathic variants with the capability to cross the blood-brain barrier. Considering the relatively low synthetic cost of the developed approach, makes these compounds suitable for preclinical studies.

1.- Tuning glycosidase inhibition through aglycone interactions: Pharmacological Chaperones for Fabry disease and GM_1 gangliosidosis. M. Aguilar-Moncayo, T. Takai, K. Higaki, T. Mena-Barragán, Y. Hirano, K. Yura, L. Li, Y. Yu, H. Ninomiya, M. I. García-Moreno, S. Ishii, Y. Sakakibara, K. Ohno, E. Nanba, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, Y. Suzuki, *Chem. Commun.* **2012**, 48, 6514-6516.

2.- *A bicyclic 1-deoxygalactonojirimycin derivative as a novel pharmacological chaperone for GM₁ gangliosidosis.* T. Takai, K. Higaki, M. Aguilar-Moncayo, T. Mena-Barragán, Y. Hirano, K. Yura, L. Yu, H. Ninomiya, M. I. García-Moreno, Y. Sakakibara, K. Ohno, E. Nanba, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, Y. Suzuki, *Mol. Ther.* **2013**, 21, 526-532.

FOURTH. Incorporation of an orthoester functionality as acid-sensitive element in the structure of sp²-iminosugars has proven a valid strategy to access pharmacological chaperones with the ability to switch the affinity as a function of the cell organelle location, that is in the endoplasmic reticulum (high affinity) or the lysosome (low affinity). Preliminary studies on human fibroblasts of GD patients provided a proof of the concept.

FIFTH. Copper(I)-assisted azide-alkyne 1,3-dipolar cycloaddition reaction was exploited to build DNJ or DMJ multiconjugates onto fullerene-[C₆₀] or βCD scaffolds. Evaluation of the inhibitory properties against a panel of glycosidases by kinetic and thermodynamic methods revealed the existence of a multivalent inhibitory effect that was particularly significant in the case of Jack bean α-mannosidase, an enzyme structurally related to human lysosomal and Golgi α-mannosidases. The multivalent inhibitory effect was found to be sensitive to the valency, distribution and spatial orientation of the iminosugar motifs, sharing some common features with the multivalent effect encountered in carbohydrate-lectin interactions.

3.- *Dramatic Effect of Multivalency on Glycosidase Inhibition with Fullerene Iminosugar Balls.* P. Compain, C. Decroocq, J. Iehl, M. Holler, D. Hazelard, T. Mena Barragán, C. Ortiz Mellet, J.-F. Nierengarten, *Angew. Chem.* **2010**, 122, 5889-5892; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 5753-5756.

4.- *The Multivalent Effect in Glycosidase Inhibition: Probing the Influence of Architectural Parameters with Cyclodextrin-based Iminosugar Click Clusters.* C.

Decroocq, D. Rodríguez-Lucena, V. Russo, T. Mena Barragán, C. Ortiz Mellet, P. Compain, *Chem. Eur. J.* **2011**, *17*, 13825-13831.

5.- *The Multivalent Effect in Glycosidase Inhibition: Probing the Influence of Valency, Peripheral Ligand Structure and Topology with Cyclodextrin-based Iminosugar Click Clusters.* C. Decroocq, A. Joosten, R. Sergent, T. Mena Barragán, C. Ortiz Mellet, P. Compain, *ChemBioChem* **2013**, *14*, 1-13.

SIXTH. In the framework of a three-month's stay in the laboratory of Prof. George, W. J. Fleet (Univ. Oxford), new methodologies for the synthesis on pyrrolidine-type iminosugars of the L-series have been devised. Recent findings have demonstrated that glycomimetics structurally related to the enantiomer of the natural substrates can actually act as specific glycosidase inhibitors.

SEVENTH. In collaboration with Prof. Antoni Riera (Univ. de Barcelona), and in view of developing new hexosaminidase inhibitors, the first synthesis of DAJNAc from non-carbohydrate precursors has been accomplished. This compound behaved as a potent inhibitor of several β -N-acetylglucosaminidasas, being particularly effective against the enzyme from human placenta.

6.- *Stereoselective Synthesis of 2-Acetamido-1,2-dideoxyallonojirimycin (DAJNAc), a New Potent Hexosaminidase Inhibitor.* A. de la Fuente, R. Martín, T. Mena-Barragán, X. Verdaguer, J. M. García Fernández, C. Ortiz Mellet, A. Riera, *Org. Lett.* **2013**, *15*, 3638-3641.

Capítulo 10

Experimental part

10. Experimental Part.

10.1. General Methods.

Thin-layer chromatography was carried out on aluminum sheets coated with *Sílica Gel 60 F₂₅₄ Merck* (0.25 mm), with visualization by iodine vapour, UV light (λ 254 nm) and by charring with 10% H₂SO₄ in ethanol; ninhydrin 0.1% in ethanol; Mostain (20 g of ammonium (VI) molybdate·4 H₂O; 0.4 g of Ce(SO₄)₂·H₂O and 10% H₂SO₄ in 400 mL of H₂O); 5% phosphomolybdic acid in EtOH and heating at 100 °C.

Column chromatography was performed on Chromagel (SDS silice 60 AC.C 35-70 μ m or 70-200 μ m).

Optical rotations were measured at room temperature in 1cm or 1dm tubes on a Jasco P-2000 polarimeter using Na line (λ 589 nm), 0.5-1% (w/v) solutions.

Elemental analyses were performed at the Instituto de Investigaciones Químicas (Sevilla, Spain) using an elemental analyser *Leco CHNS-932* o *Leco TruSpec CHN*.

IR spectra were recorded on a Jasco FT/IR-4100 (ATR) spectrometer.

UV spectra were recorded on a Jasco UV-630 spectrometer at 25 °C.

¹H (and ¹³C NMR) spectra were recorded at 300 (75.5 for ¹³C), 400 (100.6 for ¹³C) and 500 (125.7 for ¹³C) MHz with, respectively, *Bruker AVANCE 300*, *Bruker AMX400* and *Bruker AVANCE DRX 500* spectrometers. 2D COSY (*Correlated Spectroscopy*) and ¹H-¹³C (HMQC, *Heteronuclear Multiple-Quantum Coherence experiment*) experiments were used to assist on NMR assignments. CDCl₃, CD₃OD,

CD₃CN, acetone-*d*₆ and D₂O have been used as solvents.

Fast atom bombardment mass spectra were obtained with a Kratos MS-80 RFA instrument. The operating conditions were the following: the primary beam consisted of Xe atoms with a maximum energy of 8 keV; the samples were dissolved in thioglycerol, and the positive ions were separated and accelerated over a potential of 7 keV; NaI was added as cationizing agent.

For **electrospray** mass spectra, 0.1 pM sample concentrations were used, the mobile phase consisting of 50% aq acetonitrile at 0.1 mL min⁻¹ and were obtained with a Bruker Esquire 6000.

General procedure for p*K*_a determination by NMR titration.^{1,2} The p*K*_a value of **29**, **31** and **36** was determined by NMR titration. An inhibitor solution at 2 mM (9:1 H₂O-DMSO-*d*₆) containing HCl (10 mM) and NaCl (100 mM) was used an initial volume of 0.5 mL. An NMR titration was performed by injecting aliquot of 10 mM NaOH solution containing **29**, **31** and **36** (2 mM) and NaCl (100 mM) so that the concentration of inhibitors was constant during the experiment, until a total volume of 1.2 mL.

General procedure for *K*_a determination by FRET. Association constant (*K*_a) and stoichiometry values of the complex **34**:β*Glc*ase from almond at pH 7.3 were determined using fluorescence quenching of tryptophan by FRET. A Hitachi F-2500 fluorescence spectrophotometer was used at 37 ± 0.1 °C, λ_{ex} 280 nm, λ_{em} 340 nm and emitted fluorescence was recorded between 300 and 550 nm. An enzyme solution at 1.53 μM in 50 mM phosphate buffer at pH 7.3 was used using an initial volume of 1.5 mL. A titration was performed by injecting aliquot of **34** solution (20 μM in 50 mM phosphate buffer) containing β-*Glc*ase from almond (1.53 μM) so that the concentration of enzyme

was constant during the experiment, until a total volume of 1.7 mL. Concentration of inhibitor varied between 0 and 2.3 μM .

Hydrolysis experiments of orthoester-functionalized iminosugars. To 200 μL of aqueous solution of inhibitor were added 800 μL of citrate buffer (pH 5.0 or pH 5.5) and the mixture was incubated at 37 °C. At 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90 and 180 min, sample aliquots were withdrawn followed by quenching with phosphate buffer (pH 7.4). Samples were analyzed by reverse-phase HPLC (C₁₈ Kromaphase 100, 5 μm , 150 x 3 mm, 100 μL injection, gradient: 5 % B 1 min, 5-100 % B 2-16 min, A: water with 10 mM NH₄OH, B: MeCN with 10 mM NH₄OH, 1 mL/min, detection 254 nm). Peak area in μVs was plotted against time in seconds and fitted with an exponential function using Excel to give the corresponding reaction constant.

Isothermal titration calorimetry for thermodynamic determinations in the binding of inhibitors to α -Mannase. All experiments were carried out using a CSC Model 5300 Nano-ITC III. The commercial α -mannosidase solution was dialyzed against 0.1 M potassium citrate-phosphate buffer (pH 5.5) for 12 h at 4 °C and centrifuged to remove any insoluble material. The protein concentration was determined colorimetrically following the Bradford's method measuring the absorbance at 595 nm. Chemical titrations were performed at 25 °C by injecting 8-10 μL of of **119**, **120**, **123**, **127**, **133** and **134** for a total of 25 injections into a cell containing 1300 μL of a α -Mannase solution using a 900 seconds equilibration time, 360 seconds between injections and stirred at 300 rpm. Protein and inhibitors solutions were degassed prior to use. To minimize dilution artefacts, the ligand was dissolved in the same dialysis buffer as the enzyme. Data were corrected for heats of dilution by subtracting the excess heat at a high molar ratio of inhibitor to enzyme. The experiment was computer controlled using

Bindworks 3.0 software; OriginPro 8 software for data analysis. The entropy and Gibbs free energy was calculated using the equation $\Delta G = -RT\ln K_a = \Delta H - T\Delta S$.

General procedure for the inhibition assay against the commercial enzymes.

Inhibition constants (K_i) values were determined by spectrophotometrically measuring the residual hydrolytic activities of the glycosidases against the respective *o*- (for β -galactosidase from bovine liver and from *E. Coli*) or *p*-nitrophenyl α - or β -D-glycopyranoside (for other glycosidases) in the presence of each inhibitor. Substrates and enzymes were assayed in phosphate-citrate or phosphate buffer solutions at the optimal pH for the enzymes and inhibitors were assayed in water solution. The incubation mixture consisted of a 25 μ L substrate solution, 20 μ L inhibitor solution, 10 μ L enzyme solution, 15 μ L of the corresponding buffer and 30 μ L of water, until a total volume of 100 μ L. The mixture was incubated for 10-30 min at 37 °C or 55 °C (for amyloglucosidase) and the reaction was quenched by addition of 1 M Na_2CO_3 . Reaction times were appropriate to obtain 10-20% conversion of the substrate in order to achieve linear rates. The absorbance of the resulting mixture was determined at 405 nm using an ELISA Multiskan Plus reader (Menarini) in microtiter plates Nunc-Nuncion™ of 96 wells. Approximate values of K_i were determined using a fixed concentration of substrate (around the K_M value for the different glycosidases) and various concentrations of inhibitor. Full K_i determinations and enzyme inhibition mode were determined from the slope of Lineweaver-Burk plots and double reciprocal analysis. Representative examples of the Lineweaver-Burk plots, with typical profile for competitive inhibition mode. The K_m experimental values for the different glycosidases used in the tests and the corresponding working pHs are listed herein: α -Glcase (yeast), $K_m = 0.35$ mM (pH 6.8); isomaltase (yeast) $K_m = 1.0$ mM (pH 6.8), β -Glcase (almonds), $K_m = 3.5$ mM (pH 7.3 and pH 5.5); β -Glcase (bovine liver), $K_m = 1.0$ mM (pH 7.3); β -Galase (bovine liver), $K_m = 2.0$ mM (pH 7.3); β -Galase (*E. coli*), $K_m = 0.12$ mM (pH 7.3); α -Galase (coffee beans), $K_m = 2.0$ mM

(pH 6.8); trehalase (pig kidney), $K_m = 4.0$ mM (pH 6.2); amyloglucosidase (*Aspergillus niger*), $K_m = 3.0$ mM (pH 5.5); β -Mannase (*Helix pomatia*), $K_m = 0.6$ mM (pH 5.5); α -Mannase (Jack bean), $K_m = 2.0$ mM (pH 5.5); naringinase (*Penicillium decumbens*), $K_m = 2.7$ mM (pH 6.8).

Cell culture, transfection and chaperone test. Human skin fibroblasts from control subjects and patients with α -Gal A or β -Gal deficiency were maintained in our laboratories. These fibroblasts were cultured in DMEM supplemented with 10% FBS. Chaperone treatment for human fibroblasts was performed culturing cells in the medium with or without chaperones for 96 h. COS7 cells were transfected with human wild-type or mutant β -Gal expression plasmids³ using LipofectamineTM 2000 reagent. After five hours of incubation, the cells were exposed to fresh medium with or without chaperones and incubated for 48 h. Then the cells were collected for the assays as described below. Toxicity of chaperones was measured by the lactate dehydrogenase (LDH) assay in the supernatant of cultured cells.

Lysosomal enzyme assay. Lysosomal enzyme activities in cell lysates were measured by using 4-MU-conjugated substrates as 4-MU-conjugated α -D-galactopyranoside for α -Gal, β -D-galactoside for β -Gal, α -D-glucoside for α -Glu, and β -D-glucopyranoside for β -Glu.⁴ Briefly, cells in 35-mm dishes were washed with PBS (4 °C) for 3 times and scraped into 100 μ L of 0.1% Triton X-100 in H₂O. After centrifugation (6,000 rpm for 15 min at 4 °C) to remove insoluble materials, 10 μ L of lysates with 20 μ L of the substrate solution in 0.1 M citrate buffer (pH 4.5) was incubated at 37 °C for 30 min and the reaction was terminated by adding 0.2 M glycine-NaOH buffer (pH 10.7). The liberated 4-MU was measured with a fluorescence plate reader (excitation 340 nm; emission 460 nm; Infinite F500, TECAN Japan, Kawasaki, Japan). Protein concentrations were determined using Protein Assay Rapid Kit (WAKO, Tokyo, Japan) and enzyme activity was

normalized by protein concentration. Briefly, 4-MU- α -D-galactopyranoside was used as a substrate with *N*-acetyl-D-galactosamine in 0.1 M sodium citrate buffer (pH 4.5) and the reaction was terminated with 0.2 M glycine buffer (pH 10.7). The liberated 4-MU was measured with a fluorescence plate reader (Infinite F500, Tecan, Kawasaki, Japan). Protein concentration was determined by Protein Assay Rapid Kit (Wako, Tokyo, Japan).

Inhibition of α -Gal and β -Gal *in vitro*. Lysates in 0.1% Triton X-100 in H₂O of human skin fibroblasts were used for *in vitro* analysis. For the inhibition assay, lysates were mixed with 4-MU α -Gal or β -Gal substrate in the absence or presence of increasing concentrations of the corresponding iminosugar.

Subcellular fractionation. Lysates from human skin fibroblasts were subjected to continuous gradient ultracentrifugation (90,000 g for 20 h at 4°C in SW 41Ti rotor) in Opti-prep gradient (Axis-Shield, Norway) as described previously.⁵ The fractions were subjected to β -Gal enzyme assay and immunoblotting.

Prediction of the three-dimensional structure of human β -Gal with derivative **29.** Amino acid sequence of human β -Gal was obtained from GenBank (accession: M27507). The first 23 amino acid residues that encode a single peptide were not included in the analysis. BLAST program was used to find proteins with high amino acid sequence similarities in Protein Data Bank and chain A in the entry 3d3a was found to be the most appropriate template for comparative modeling. Amino acid sequence alignment was performed by ALAdeGA, and 20 different coordinate sets were built by MODELLER. The structure with the least DOPE energy was selected as the best model. The 3D structure of **29** was built from the crystal structure of a related sp²-iminosugar-type bicyclic nojirimycin (NJ) derivative in the active site of acid β -glucosidase. Derivative **29** was placed on to the modeled β -Gal structure using X-ray data for proteins

homologous to 3d3a with a ligand at the active site as templates. Chains A in entries 1xc6, 3ogr, 3ogs, and 3og2 had a carbohydrate molecule at the active site. These protein:ligand complex structures were superimposed to the modeled structure of β -Gal and the ligand coordinates were transferred. Then, **29** was appropriately superimposed to the ligands in order to obtain the modeled structure of human β -Gal docked with the chaperone.

Immunofluorescence. All the procedures were carried out at room temperature as described previously.^{5,6} Cells on the coverslips were fixed with 4% paraformaldehyde in phosphate buffered saline (PBS) for 30 min. Cells or brain sections were permeabilized with 0.25% Triton X-100 in PBS for 15 min, blocked with 1% bovine serum albumin (BSA) for 1 h, and incubated with primary antibodies for 1 h. Bound antibodies were detected with Alexa-Fluor-conjugated secondary antibodies for 1 h. Samples were mounted on slides with mounting media (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) and fluorescence images were obtained sequentially using a confocal laser microscopy (Leica TSC SP-2; Wetzler, Germany). Fluorescence intensity was measured using Leica confocal software.

Immunoblotting. All the procedures were carried out at 4 °C. Cultured cells or the brain tissues were lysed by sonication in 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, and a protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics). Detergent-resistant membrane microdomains that are insoluble to Triton X-100 (1%) were obtained by incubating the lysates from cortex in Triton X-100 (1%) on ice for 30 min. After centrifugation at 100,000 x g for 30 min, the supernatant was discarded and the insoluble pellets were suspended in the same extraction buffer. Protein concentrations were determined using the Protein Assay Rapid kit (WAKO, Tokyo, Japan). Immunoblotting was performed as described.⁵ Signals from horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies were visualized by ECL detection kit (GE

Healthcare Bioscience) and images were obtained using LAS-4000 lumino image analyzer (Fujifilm, Tokyo, Japan).

Mice and tissue collection. C57BL/6-based congenic strain with β -Gal knockout (β -gal^{-/-}) mice and those expressing human mutant R201C enzyme (R201C mice) have been reported.⁷ All procedures were carried out according to the protocols approved by the committee for animal experiments in Tottori University. For immunostaining, mice were anesthetized and perfused with 4% paraformaldehyde in sodium phosphate, pH 7.4. Brains were embedded in OCT compound (Sakura Finetechnical Co., Tokyo, Japan), and 8 μ m sections were cut using a cryostat. For protein extractions, tissues were removed and frozen in liquid nitrogen. R201C mice were treated orally with an aqueous solution of 6S-NBI-DGJ for a week.^{7a} Untreated control mice were given water.

General Methods in Homogeneous Synthesis.

Acetylation was carried out by dissolving the compound in Ac₂O-py (1:1, 10 mL/g) at 0 °C. the reaction mixture was stieed at room temperature, then poured into water/ice and extracted with CH₂Cl₂. Organic layer was washed with 2 N H₂SO₄ and saturated aqueous solution of NaHCO₃, then dried (MgSO₄) and concentrated. The resulting residue was purified by column chromatography.

Deacetylation was carried out using Zemplén procedure.⁸ Addition f 1 M MeONa (0.1 equiv./Ac mol) in MeOH at room temperature, followed by neutralization with solid CO₂, evaporation of the solvent and purification by column chromatography in some cases.

Boc cleavage was achieved by treatment with 1:1 CH₂Cl₂-TFA or 1:1 H₂O-TFA at room temperature for 2 h. then, the solvent was eliminated under reduced pressure and

coevaporated several times with water. The residue was submitted to column chromatography in most cases and the pure compound was dissolved in a HCl diluted solution and freeze-dried to yield the product as hydrochloride.

CuAAC reaction was carried out in a microwave reactor vial, alkyne, azide, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.1 equiv. per alkyne), and sodium ascorbate (0.2 equiv. per alkyne) in DMF/ H_2O were successively added. The resulting suspension was heated under microwave irradiation at 80 °C for 30 min., water was added and the aqueous phase was extracted with EtOAc. The organic phases were combined, dried (Na_2SO_4) and concentrated under reduced pressure. Traces of copper salts were removed by filtration under silica gel eluting with $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}/\text{NH}_4\text{OH}$ (15/0.5/0.5) and the residue was then purified by column chromatography.

10.2. Starting Materials.

5-Azido-5-deoxy-1,2-*O*-isopropylidene- α -D-glucofuranose (**215**).⁹

1-Deoxynojirimycin (DNJ).⁹

5-Azido-5-deoxy-1,2-*O*-isopropylidene- α -L-idofuranose (**177**).⁹

1-Deoxy-L-idonojirimycin (L-DIJ).¹⁰

5,6-Diazido-5,6-dideoxy-1,2-*O*-isopropylidene- α -D-glucofuranose (**181**).¹¹

6-Amino-1,6-dideoxynojirimycin (6N-DNJ).

1-Deoxygalactonojirimycin (DGJ).¹²

4-(*tert*-Butoxycarbonylamino)butylisothiocyanate (**40**).¹³

N-(*tert*-Butoxycarbonyl)-*N*-dansyl-1,4-butanodiamine (**41**).

N-Dansyl-1,4-butanodiamine (**42**).

4-(Dansylamino)butylisothiocyanate (**43**).

N-(2',3'-Dihydroxypropyl)trifluoroacetamide (**44**).¹⁴

N-(2'-Methoxy-[1',3']dioxolan-4'-ylmethyl)trifluoroacetamide (**47**).¹⁴

N-(2'-Alkylloxy-[1',3']dioxolan-4'-yl)-methylisothiocyanates.^{14,15}

5-Deoxy-1,2-*O*-isopropylidene-5-[*N'*-(2-*tert*-butoxycarbonylamino)-ethylthioureido]- β -L-idofuranose (**196**).¹⁶

(1*S*,2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-*N*-(*N'*-2-Aminoethylthiocarbamoyl)-2,3,4-trihydroxy-6-oxa-*nor*-tropane (**87**).

5-Azido-3,6-di-*O*-benzyl-5-deoxy-L-idofuranose (**208**).¹⁷

5-Azido-3,6-di-*O*-benzyl-5-deoxy-L-idono-1,4-lactone (**209**).

5-Azido-3,6-di-*O*-benzyl-5-deoxy-2-*O*-trifluoromethanesulfonyl-L-idono-1,4-lactone (**135**).

5-Azido-3,6-di-*O*-benzyl-5-deoxy-L-gulono-1,4-lactone (**136**).

5-Azido-3,6-di-*O*-benzyl-5-deoxy-2-*O*-methanesulfonyl-L-gulono-1,4-lactone (**137**).

2-Azido-1,4-di-*O*-benzyl-2-deoxy-5-*O*-methanesulfonyl-D-glucitol (**138**).

Methyl 5-azido-3,6-di-*O*-benzyl-5-deoxy-2-*O*-methanesulfonyl-L-gulonamide (**139**).

2,3,4,6-Tetra-*O*-benzyl-1-deoxynojirimycin (**201**).¹⁸

Functionalized (C₆₀-T_h)-[5,6] hexa adduct (**197**).¹⁹

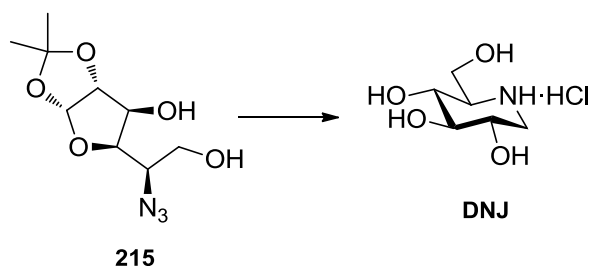
Heptakis(2,3-di-*O*-methyl-6-*O*-propargyl)cyclomaltoheptose (**202**).²⁰

Heptakis(2,6-di-*O*-propargyl)cyclomaltoheptose (**206**).²¹

Heptakis(2,3-di-*O*-propargyl)cyclomaltoheptose (**204**).²²

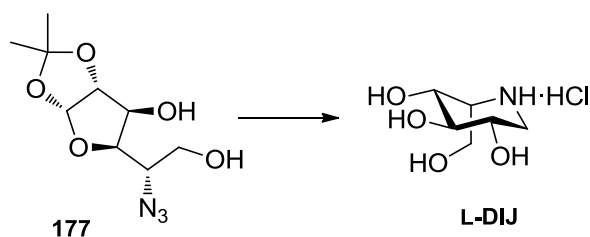
N-((6*R*,8*aS*)-3-*O*xo-3,5,6,8*a*-tetrahydro-1*H*-oxazolo[3,4-*a*]pyridin-6-yl)acetamide (**155**).²³

Preparation of 1-deoxynojirimycin hydrochloride (DNJ).



5-Azido-5-deoxy-1,2-*O*-isopropylidene- α -D-glucofuranose **215** (1.0 g, 4.28 mmol) was treated with TFA-H₂O (5:1, 20 mL) at 0 °C for 15 min, concentrated and coevaporated several times with water until neutral pH. To a solution of the crude in dioxane-H₂O (4:1, 25 mL), Pd/C (480 mg) and 6 M HCl (until pH 5-6) were added and the mixture reaction was stirred at rt under H₂ atmosphere (30 bar) for 20 h. The catalyst was filtered off and the solution concentrated. The resulting residue was purified by column chromatography (6:1:1 \rightarrow 6:3:1 CH₃CN-H₂O-NH₄OH). Yield: 647 mg (76% over two steps). Physical and spectroscopical data are according with those described in literature.⁹

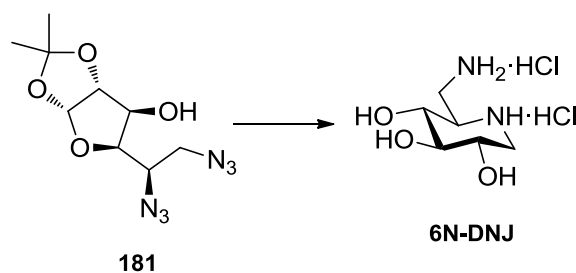
Preparation of 1-deoxy-L-idonojirimycin hydrochloride (L-DIJ).



5-Azido-5-deoxy-1,2-*O*-isopropylidene- α -L-idofuranose **177** (110 mg, 0.448 mmol) was treated with TFA-H₂O (5:1, 3 mL) at 0 °C for 15 min, concentrated and coevaporated several times with water until neutral pH. To a solution of the crude in dioxane-H₂O (4:1, 8 mL), Pd/C (70 mg) and 6 M HCl (until pH 5-6) were added and the mixture reaction was stirred at rt under H₂ atmosphere (30 bar) for 20 h. The catalyst was

filtered off and the solution concentrated. The resulting residue was purified by column chromatography (6:1:1 \rightarrow 6:3:1 $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O-NH}_4\text{OH}$) and lyophilized as hydrochloride. Yield: 60 mg (67% over two steps). Physical and spectroscopical data are according with those described in literature.¹⁰

Preparation of 6-amino-1,6-dideoxynojirimycin dihydrochloride (6N-DNJ).



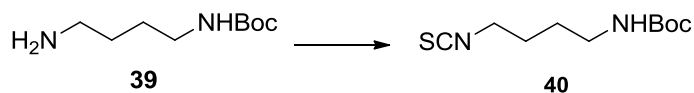
5,6-Diazido-5,6-dideoxy-1,2-*O*-isopropylidene- α -D-glucofuranose¹¹ **181** (420 mg, 1.55 mmol) was treated with TFA- H_2O (9:1, 8 mL) at 0 °C for 2 h, concentrated and coevaporated several times with water until neutral pH. To a solution of the crude in dioxane- H_2O (4:1, 32 mL), Pd/C (280 mg) and 6 M HCl (until pH 5-6) were added and the mixture reaction was stirred at rt under H_2 atmosphere (30 bar) for 48 h. The catalyst was filtered off and the solution concentrated. The resulting residue was purified by column chromatography (6:1:1 \rightarrow 6:3:1 $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O-NH}_4\text{OH}$). Yield: 244 mg (67% over two steps). R_f 0.30 (6:3:1 $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O-NH}_4\text{OH}$). $[\alpha]_D + 20.8$ (c 1.0, H_2O).

^1H NMR (500 MHz, D_2O) δ 3.87 (ddd, 1 H, $J_{1b,2} = 11.6$ Hz, $J_{2,3} = 9.1$ Hz, $J_{1a,2} = 5.2$ Hz, H-2), 3.76 (dd, 1 H, $J_{4,5} = 10.1$ Hz, $J_{3,4} = 9.1$ Hz, H-4), 3.66 (dd, 1 H, $J_{1a,1b} = 12.5$ Hz, $J_{1a,2} = 5.2$ Hz, H-1a), 3.64 (dd, 1 H, $J_{6a,6b} = 13.1$ Hz, $J_{6a,5} = 6.8$ Hz, H-6a), 3.61 (t, 1 H, H-3), 3.59 (m, 1 H, H-5), 3.49 (dd, 1 H, $J_{5,6b} = 4.5$ Hz, H-6b), 3.09 (dd, 1 H, $J_{1b,2} = 11.7$ Hz, H-1b).

^{13}C NMR (125.7 MHz, D_2O) δ 75.9 (C-3), 71.1 (C-4), 67.4 (C-2), 55.4 (C-5), 46.4 (C-1), 39.4 (C-6).

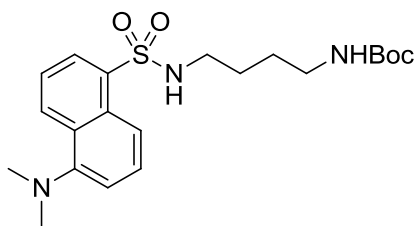
ESIMS m/z 163 ($[M + Na]^+$). HRMS $C_6H_{15}N_2O_3$ found 163.1085, ($M + H$)⁺ requires 163.1083.

Preparation of 4-(*tert*-butoxycarbonylamino)butylisothiocyanate (40).



To a solution of commercial *N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-1,4-butanodiamine **39** (0.73 mmol, 0.14 mL) in CH_2Cl_2 - H_2O (1:1, 9 mL) were added CaCO_3 (584 mg, 5.8 mmol) and CSCl_2 (0.22 mL, 2.9 mmol) at 0 °C and the mixture was stirred for 1 h. Then, the aqueous layer was washed with CH_2Cl_2 (3 x 10 mL), dried (MgSO_4), filtered and the solvent was evaporated. The residue was purified by column chromatography (1:4 acetone-cyclohexane). Yield: 158 mg (quantitative). R_f 0.53 (1:2 acetone-cyclohexane). Physical and spectroscopical data are according with those described in literature.¹³

Preparation of *N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-*N*-dansyl-1,4-butanodiamine (41).



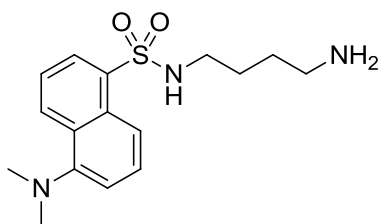
To a solution of commercial *N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-1,4-diaminobutane (115 μL , 0.6 mmol) in DMF (26 mL), Et_3N (93 μL , 0.66 mmol) and dansyl chloride (140 mg, 0.6 mmol) were added. The mixture was stirred at 0 °C for 4 h, under Ar atmosphere. The solvent was evaporated under reduced pressure and the residue was purified by column chromatography (1:4 \rightarrow 1:2 acetone-cyclohexane). Yield: 239 mg (95%). R_f 0.35 (1:2 acetone-cyclohexane).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.55-7.17 (m, 6 H, dansyl), 4.92 (bs, 1 H, NHSO_2), 4.43 (bs, 1 H, NHBoc), 2.94 (m, 10 H, CH_2NHBoc , CH_2NHSO_2 , NMe_2), 1.43 (m, 13 H, CH_2CH_2 , CMe_3).

^{13}C NMR (75.5 MHz, CDCl_3) δ 156.1 (CO), 152.1-115.3 (dansyl), 79.3 (CMe_3), 46.5 (NMe_2), 43.0 (CH_2NHSO_2), 39.9 (CH_2NHBoc), 28.5 (CMe_3), 27.2, 26.8 (CH_2).

FABMS m/z 444 (20, $[\text{M} + \text{Na}]^+$), 422 (15, $[\text{M} + \text{H}]^+$), 421 (30, $[\text{M}]^+$). Anal. Calcd. for $\text{C}_{21}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$: C, 59.83; H, 7.41; N, 9.97; S, 7.61. Found: C, 59.96; H, 7.506; N, 9.78; S, 7.33.

Preparation of *N*-dansyl-1,4-butanodiamine (**42**).

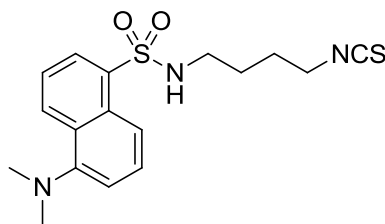


Compound **41** (200 mg, 0.47 mmol) was treated with TFA- H_2O (1:1, 7 mL) at 0 °C for 1 h, concentrated and coevaporated several times with water. The resulting residue was purified by column chromatography (80:10:1 \rightarrow 60:10:1 \rightarrow 40:10:1 CH_2Cl_2 -MeOH- H_2O). Yield: 197 mg (quantitative). R_f 0.33 (40:10:1 CH_2Cl_2 -MeOH- H_2O).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.58-7.29 (m, 6 H, dansyl), 2.90 (s, 6 H, NMe_2), 2.85 (m, 4 H, CH_2NH_2 , CH_2NHSO_2), 1.65, 1.50 (m, 4 H, CH_2CH_2).

^{13}C NMR (75.5 MHz, CDCl_3) δ 152.8-116.6 (dansyl), 79.3 (CMe_3), 45.8 (NMe_2), 43.0 (CH_2NHSO_2), 40.2 (CH_2NH_2), 27.6, 25.6 (CH_2).

FABMS m/z 344 (40, $[\text{M} + \text{Na}]^+$), 322 (80, $[\text{M} + \text{H}]^+$), 321 (10, $[\text{M}]^+$). Anal. Calcd. for $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$: C, 59.78; H, 7.21; N, 13.07; S, 9.98. Found: C, 59.64; H, 6.987; N, 12.81; S, 9.60.

Preparation of 4-(dansylamino)butylisothiocyanate (43).

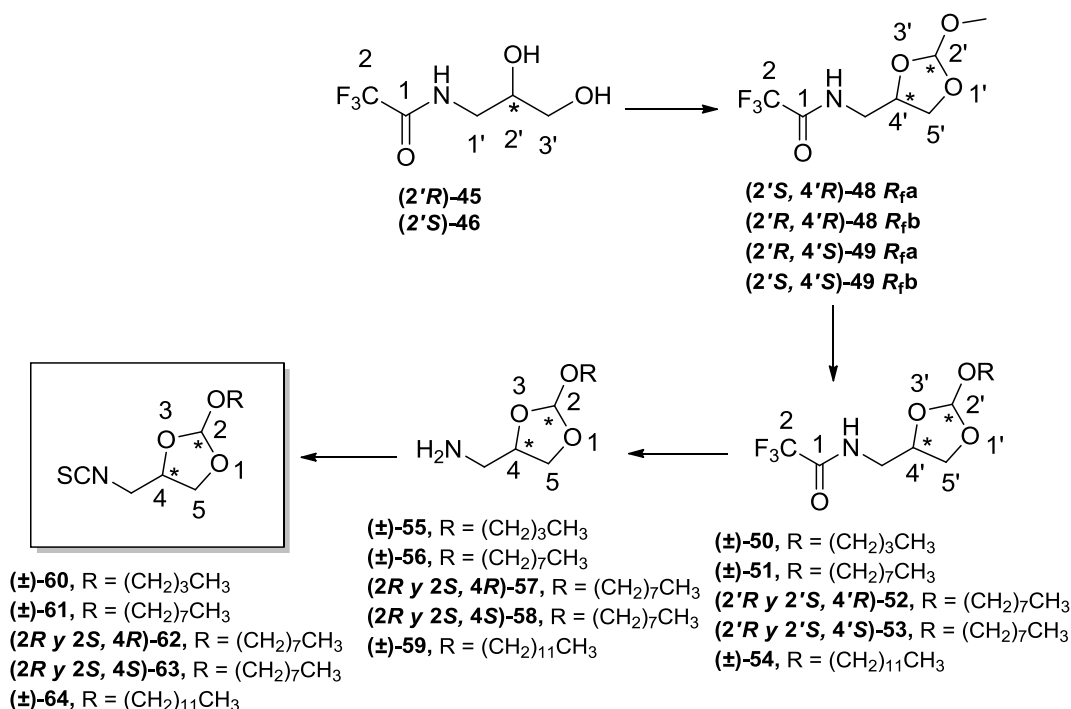
Compound **42** (172 mg, 0.53 mmol) in CH_2Cl_2 - H_2O (1:1, 7 mL), CaCO_3 (428 mg, 4.28 mmol) and CSCl_2 (164 μL , 2.14 mmol) were added. The mixture was stirred at 0 °C for 1 h, under Ar atmosphere. Then, the mixture was diluted with CH_2Cl_2 (3 mL) and washed with H_2O (5 mL). The aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 (3 x 5 mL). The combined organic phases were dried (MgSO_4), filtered and evaporated. The resulting residue was purified by column chromatography (1:4 \rightarrow 1:2 acetone-cyclohexane). Yield: 157 mg (81%). R_f 0.35 (1:2 acetone-cyclohexane).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 8.57-7.19 (m, 6 H, dansyl), 4.86 (t, 1 H, $J_{\text{NH,CH}} = 6.3$ Hz, NHSO_2), 3.36 (t, 2 H, CH_2NCS), 2.90 (m, 8 H, NMe_2 , CH_2NHSO_2), 1.62, 1.52 (m, 4 H, CH_2CH_2).

^{13}C NMR (75.5 MHz, CDCl_3) δ 152.1-115.4 (dansyl), 129.6 (CS), 45.5 (NMe_2), 44.5 (CH_2NHSO_2), 42.5 (CH_2NCS), 26.9, 26.7 (CH_2).

FABMS m/z 386 (80, $[\text{M} + \text{Na}]^+$), 364 (50, $[\text{M} + \text{H}]^+$). Anal. Calcd. for $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}_2$: C, 56.17; H, 5.82; N, 11.56; S, 17.64. Found: C, 56.25; H, 5.744; N, 11.41; S, 17.31.

Preparation of orthoesters armed with isothiocyanate group.



(2'R)-N-(2',3'-Dihydroxypropyl)trifluoroacetamide (45). To a solution of commercial (*R*)-3-aminopropane-1,2-diol (1 g, 11.32 mmol) in DMF (5.9 mL) was dropwise added ethyltrifluoroacetate (1.62 mL, 13.58 mmol) at 0 °C. The reaction mixture was allowed to reach rt and was stirred for 2 h. The solvent was evaporated, EtOAc (20 mL) was added and the organic phase was washed with 0.5 M KHSO₄ (2 x 10 mL), brine (10 mL), dried (MgSO₄), filtered and evaporated. The resulting residue was purified by column chromatography (9:1 CH₂Cl₂-MeOH). Yield: 1.56 g (75%). *R_f* 0.74 (5:1 CH₂Cl₂-MeOH). [α]_D + 23.5 (*c* 1.0, MeOH).

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 3.76 (m, 1 H, H-2'), 3.52 (m, 1 H, H-3'a), 3.50 (m, 1 H, H-3'b), 3.44 (dd, 1 H, $J_{1'a,1'b} = 13.7$ Hz, $J_{1'a,2'} = 5.4$ Hz, H-1'a), 3.29 (dd, 1 H, $J_{3b,2} = 7.3$ Hz, H-1'b).

^{13}C NMR (75.5 MHz, CD_3OD) δ 159.3 (CO), 117.6 (CF_3), 71.3 (C-2'), 67.2 (C-3'), 43.9 (C-1').

ESIMS m/z 210 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. HRMS $\text{C}_5\text{H}_9\text{F}_3\text{NO}_3$ found 188.0530, $[\text{M} + \text{H}]^+$ requires 188.0535.

(2'S)-N-(2',3'-Dihydroxypropyl)trifluoroacetamide (46). Compound **46** was obtained from (*S*)-3-aminopropane-1,2-diol (1.0 g, 11.32 mmol) following the procedure described for **45**. Column chromatography (9:1 CH_2Cl_2 -MeOH). Yield: 1.67 g (79%). R_f 0.74 (5:1 CH_2Cl_2 -MeOH). $[\alpha]_D - 25.7$ (*c* 1.0, MeOH).

^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ 3.76 (m, 1 H, H-2'), 3.52 (m, 1 H, H-3'a), 3.50 (m, 1 H, H-3'b), 3.44 (dd, 1 H, $J_{1'a,1'b} = 13.6$ Hz, $J_{1'a,2} = 4.7$ Hz, H-1'a), 3.29 (dd, 1 H, $J_{1'b,2} = 7.4$ Hz, H-1'b).

^{13}C NMR (75.5 MHz, CD_3OD) δ 159.3 (CO), 117.6 (CF_3), 71.2 (C-2'), 67.1 (C-3'), 43.8 (C-1').

ESIMS m/z 210 $[\text{M} + \text{Na}]^+$. HRMS $\text{C}_5\text{H}_9\text{F}_3\text{NO}_3$ found 188.0535, $[\text{M} + \text{H}]^+$ requires 188.0535.

(2'S,4'R)-N-(2'-Methoxy-[1',3']dioxolan-4'-ylmethyl)trifluoroacetamide (48 R_{fa}). To a solution of **48** (2.65 g, 14 mmol) in CH_2Cl_2 (7 mL), trimethyl orthoformate (6.58 g, 62 mmol) and PTSA (2.9 mg, 0.144 mmol) were added and the resulting solution was stirred at rt. for 2 h. After dilution with CH_2Cl_2 (70 mL), the organic phase was washed with saturated aqueous NaHCO_3 (3 x 70 mL) and brine (70 mL), dried (K_2CO_3), filtered and the solvent was evaporated to a residue which was purified by column chromatography (1:2 EtOAc-cyclohexane). Yield: 1.28 g (40%). R_f 0.59 (1:2 EtOAc-cyclohexane). $[\alpha]_D - 8.8$ (*c* 1.0, acetone).

^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ 7.53 (bs, 1 H, NH), 5.68 (s, 1 H, H-2'), 4.45 (m, 1 H, H-4'), 4.08 (dd, 1 H, $J_{5'a,5'b} = 8.3$ Hz, $J_{5'a,4'} = 7.7$ Hz, H-5'a), 4.08 (dd, 1 H, $J_{5'b,4'} =$

7.3 Hz, H-5'b), 3.60 (ddd, 1 H, $J_{6'a,6'b} = 14.5$ Hz, $J_{6'a,4'} = 7.1$ Hz, $J_{6'a,NH} = 3.5$ Hz, H-6'a), 3.50 (m, 1 H, H-6'b), 3.33 (s, 3 H, OMe).

^{13}C NMR (75.5 MHz, CD_3OD) δ 157.7 (CO), 116.0 (C-2'), 115.8 (CF_3), 74.0 (C-4'), 64.5 (C-5'), 52.3 (OMe), 40.8 (C-6').

ESIMS m/z 252 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$). HRMS $\text{C}_7\text{H}_9\text{F}_3\text{NO}_4$ found 228.0483, $[\text{M} - \text{H}]^-$ requires 228.0484.

(2'R,4'R)-N-(2'-Methoxy-[1',3']dioxolan-4'-ylmethyl)trifluoroacetamide (48 R_b). Compound **48 R_b** was obtained from **45** (2.65 g, 14 mmol) following the procedure described for **48**. Column chromatography (1:2 EtOAc-cyclohexane). Yield: 1.09 g (34%). R_f 0.54 (1:2 EtOAc-cyclohexane). $[\alpha]_D + 2.2$ (c 1.0, acetone).

^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ 6.70 (bs, 1 H, NH), 5.74 (s, 1 H, H-2'), 4.44 (m, 1 H, H-4'), 4.14 (dd, 1 H, $J_{5'a,5'b} = 8.3$ Hz, $J_{5'a,4'} = 7.0$ Hz, H-5'a), 3.66 (dd, 1 H, $J_{5'b,4'} = 5.1$ Hz, H-5'b), 3.60 (ddd, 1 H, $J_{6'a,6'b} = 14.2$ Hz, $J_{6'a,4'} = 5.9$ Hz, $J_{6'a,NH} = 3.5$ Hz, H-6'a), 3.38 (m, 1 H, H-6'b), 3.29 (s, 3 H, OMe).

^{13}C NMR (75.5 MHz, CD_3OD) δ 157.7 (CO), 116.0 (C-2'), 115.7 (CF_3), 73.3 (C-4'), 65.7 (C-5'), 52.0 (OMe), 41.8 (C-6').

ESIMS m/z 252 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$). HRMS $\text{C}_7\text{H}_9\text{F}_3\text{NO}_4$ found 228.0480, $[\text{M} - \text{H}]^-$ requires 228.0484.

(2'R,4'S)-N-(2'-Methoxy-[1',3']dioxolan-4'-ylmethyl)trifluoroacetamide (49 R_a). Compound **49 R_a** was obtained from **46** (2.65 g, 14 mmol) following the procedure described for **48 R_a** . Column chromatography (1:2 EtOAc-cyclohexane). Yield: 1.35 g (42%). R_f 0.57 (1:2 EtOAc-cyclohexane). $[\alpha]_D + 6.9$ (c 1.0, acetone).

^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ 7.56 (bs, 1 H, NH), 5.71 (s, 1 H, H-2'), 4.47 (m, 1 H, H-4'), 4.11 (dd, 1 H, $J_{5'a,5'b} = 8.3$ Hz, $J_{5'a,4'} = 7.6$ Hz, H-5'a), 3.71 (dd, 1 H, $J_{5'b,4'} =$

7.3 Hz, H-5'b), 3.64 (ddd, 1 H, $J_{6'a,6'b} = 14.6$ Hz, $J_{6'a,4'} = 7.1$ Hz, $J_{6'a,NH} = 3.5$ Hz, H-6'a), 3.53 (m, 1 H, H-6'b), 3.36 (s, 3 H, OMe).

^{13}C NMR (75.5 MHz, CD_3OD) δ 157.4 (CO), 116.0 (C-2'), 115.8 (CF_3), 73.3 (C-4'), 65.7 (C-5'), 52.0 (OMe), 41.8 (C-6').

ESIMS m/z 252 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$). HRMS $\text{C}_7\text{H}_9\text{F}_3\text{NO}_4$ found 228.0475, $[\text{M} - \text{H}]^-$ requires 228.0484.

(2'S,4'S)-N-(2'-Methoxy-[1',3']dioxolan-4'-ylmethyl)trifluoroacetamide (49 R_b). Compound **48 R_b** was obtained from **46** (2.65 g, 14 mmol) following the procedure described for **48 R_a**. Column chromatography (1:2 EtOAc-cyclohexane). Yield: 1.19 g (37%). R_f 0.50 (1:2 EtOAc-cyclohexane). $[\alpha]_D - 6.2$ (c 1.0, acetone).

^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ 6.64 (bs, 1 H, NH), 5.75 (s, 1 H, H-2'), 4.46 (m, 1 H, H-4'), 4.17 (dd, 1 H, $J_{5'a,5'b} = 8.3$ Hz, $J_{5'a,4'} = 7.0$ Hz, H-5'a), 3.69 (dd, 1 H, $J_{5'b,4'} = 5.1$ Hz, H-5'b), 3.63 (ddd, 1 H, $J_{6'a,6'b} = 14.1$ Hz, $J_{6'a,4'} = 6.1$ Hz, $J_{6'a,NH} = 3.4$ Hz, H-6'a), 3.40 (m, 1 H, H-6'b), 3.32 (s, 3 H, OMe).

^{13}C NMR (75.5 MHz, CD_3OD) δ 157.7 (CO), 116.0 (C-2'), 115.7 (CF_3), 74.0 (C-4'), 64.5 (C-5'), 52.3 (OMe), 40.8 (C-6').

ESIMS m/z 252 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$). HRMS $\text{C}_7\text{H}_9\text{F}_3\text{NO}_4$ found 228.0493, $[\text{M} - \text{H}]^-$ requires 228.0484.

(±)-N-(2'-Butyloxy-[1',3']dioxolan-4'-ylmethyl)trifluoroacetamide (50). To a solution of **48** (2.5 g, 10.9 mmol) in toluene (17 mL), 1-butanol (0.81 g, 10.9 mmol) and pyridinium *p*-toluenesulfonate (28 mg, 0.11 mmol) were added. The resulting solution was stirred under reflux for 2 h. After addition of cyclohexane (100 mL), the organic layer was washed with saturated aqueous NaHCO_3 (3 x 30 mL) and brine (30 mL), dried (K_2CO_3), filtered and the solvent was eliminated. The residue was purified by column chromatography (1:6 EtOAc-cyclohexane). Yield: 2.13 g (72%). R_f 0.38 (1:4 EtOAc-cyclohexane).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.48 (bs, 2 H, NH), 6.69 (bs, 2 H, NH), 5.84, 5.79 (s, 4 H, H-2'), 4.48 (m, 4 H, H-4'), 4.20-4.05 (m, 4 H, H-5'a), 3.80-3.73 (m, 4 H, H-5'b), 3.72-3.39 (m, 16 H, H-6'a, H-6'b, CH_2O), 1.57 (m, 8 H, OCH_2CH_2), 1.38 (m, 8 H, CH_2), 0.88 (t, 12 H, $^3J = 7.4$ Hz, CH_3).

^{13}C NMR (100.6 MHz, CDCl_3 , 313 K) δ 158.1, 157.8 (CO), 115.7 (CF_3), 115.7, 115.6 (C-2'), 74.0, 73.4 (C-4'), 65.9, 65.1, (CH_2O), 65.7, 64.5 (C-5'), 42.0, 41.0 (C-6'), 31.5, 31.3, 19.3, 19.2 (CH_2), 13.8 (CH_3).

ESIMS m/z 294.0 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$). Anal. Calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{F}_3\text{NO}_4$: C, 44.28; H, 5.95; N, 5.16. Found: C, 44.26; H, 5.87; N, 5.07.

(\pm)-*N*-(2'-Octyloxy-[1',3']dioxolan-4'-ylmethyl)trifluoroacetamide (51).

Compound **50** was obtained from **47** (2.5 g, 10.9 mmol) following the procedure described for **51** using 1-octanol. Column chromatography (1:6 EtOAc-cyclohexane). Yield: 2.24 g (63%). R_f 0.53 (1:3 EtOAc-cyclohexane).

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.49 (bs, 2 H, NH), 6.65 (bs, 2 H, NH), 5.84, 5.79 (s, 4 H, H-2'), 4.48 (m, 4 H, H-4'), 4.20-4.05 (m, 4 H, H-5'a), 3.80-3.74 (m, 4 H, H-5'b), 3.72-3.39 (m, 16 H, H-6'a, H-6'b, CH_2O), 1.57 (m, 8 H, OCH_2CH_2), 1.27 (m, 40 H, CH_2), 0.88 (t, 12 H, $^3J = 6.5$ Hz, CH_3).

^{13}C NMR (125.7 MHz, CDCl_3) δ 158.1, 157.8 (CO), 115.7 (CF_3), 115.7, 115.5 (C-2'), 74.0, 73.4 (C-4'), 66.3, 65.4 (CH_2O), 65.7, 63.3 (C-5'), 42.0, 41.0 (C-6'), 32.9, 31.9, 29.5, 29.4, 29.3, 26.2, 26.1, 25.9, 22.7 (CH_2), 14.2 (CH_3).

ESIMS m/z 350.1 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$). Anal. Calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{F}_3\text{NO}_4$: C, 51.37; H, 7.39; N, 4.28. Found: C, 51.41; H, 7.36; N, 4.29.

(4'*R*)-*N*-(2'-Octyloxy-[1',3']dioxolan-4'-ylmethyl)trifluoroacetamide (52).

Compound **52** was obtained from **48** (2.5 g, 10.9 mmol) following the procedure

described for **50** using 1-octanol. Column chromatography (1:6 EtOAc-cyclohexane). Yield: 2.85 g (80%). R_f 0.59 (1:6 EtOAc-cyclohexane). $[\alpha]_D - 6.4$ (c 1.0, CH_2Cl_2).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.55, 6.87 (bs, 2 H, NH), 5.78 (s, 2 H, H-2'), 4.46 (m, 2 H, H-4'), 4.15 (dd, 1 H, $J_{5'a,5'b} = 8.2$ Hz, $J_{5'a,4'} = 7.0$ Hz, H-5'a^I), 4.08 (m, 1 H, H-5'a^{II}), 3.72 (dd, 1 H, $J_{5'b,4'} = 7.4$ Hz, H-5'b^I), 3.51 (m, 9 H, H-5'b^{II}, H-6'a^I, H-6'a^{II}, H-6'b^I, H-6'b^{II}, CH_2O), 1.53 (m, 4 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 1.26 (m, 20 H, CH_2), 0.86 (t, 6 H, $^3J = 6.1$ Hz, CH_3).

^{13}C NMR (75.5 MHz, CDCl_3) δ 157.6 (CO), 115.8 (CF_3), 115.5, 115.3 (C-2'), 73.9, 73.2 (C-4'), 66.0, 65.2 (CH_2O), 65.6, 64.4 (C-5'), 41.8, 40.9 (C-6'), 32.7, 31.7, 29.3, 29.2, 29.1, 26.6, 25.5, 22.5 (CH_2), 13.9 (CH_3).

ESIMS m/z 364 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$). HRMS $\text{C}_{14}\text{H}_{25}\text{F}_3\text{NO}_4$ found 328.1730, $[\text{M} + \text{H}]^+$ requires 328.1736.

(4'S)-N-(2'-Octyloxy-[1',3']dioxolan-4'-ylmethyl)trifluoroacetamide (53).

Compound **53** was obtained from **49** (2.5 g, 10.9 mmol) following the procedure described for **50** using 1-octanol. Column chromatography (1:6 EtOAc-cyclohexane). Yield: 1.89 g (53%). R_f 0.34 (1:6 EtOAc-cyclohexane). $[\alpha]_D + 6.3$ (c 1.0, CH_2Cl_2).

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 7.47, 6.65 (bs, 2 H, NH), 5.84, 5.79 (s, 2 H, H-2'), 4.46 (m, 2 H, H-4'), 4.15 (dd, 1 H, $J_{5'a,5'b} = 7.8$ Hz, $J_{5'a,4'} = 7.2$ Hz, H-5'a^I), 4.10 (dd, 1 H, $J_{5'a,4'} = 7.5$ Hz, H-5'a^{II}), 3.77-3.36 (m, 10 H, H-5'b^I, H-5'b^{II}, H-6'a^I, H-6'a^{II}, H-6'b^I, H-6'b^{II}, CH_2O), 1.58 (m, 4 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 1.27 (m, 20 H, CH_2), 0.86 (t, 6 H, $^3J = 5.4$ Hz, CH_3).

^{13}C NMR (75.5 MHz, CDCl_3) δ 158.0, 157.6, 156.5, 155.9 (CO), 115.6 (C-2'), 115.4 (CF_3), 73.8, 73.2 (C-4'), 66.1, 65.2, 64.4, 63.0 (CH_2O , C-5'), 41.8, 40.8 (C-6'), 32.7, 31.7, 29.3, 29.2, 29.1, 26.6, 25.5, 22.5 (CH_2), 13.8 (CH_3).

ESIMS m/z 364 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$). HRMS $\text{C}_{14}\text{H}_{25}\text{F}_3\text{NO}_4$ found 328.1738, $[\text{M} + \text{H}]^+$ requires 328.1736.

(±)-N-(2'-dodecyloxy-[1',3']dioxolan-4'-ylmethyl)trifluoroacetamide (54).

Compound **54** was obtained from **44** (2.5 g, 10.9 mmol) following the procedure described for **54** using 1-dodecanol. Column chromatography (1:6 EtOAc-cyclohexane). Yield: 3.01 g (72%). R_f 0.36 (1:9 EtOAc-cyclohexane).

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.51, 6.67 (bs, 2 H, NH), 5.84, 5.79 (s, 4 H, H-2'), 4.47 (m, 4 H, H-4'), 4.19-4.08 (m, 4 H, H-5'a^I, H-5'a^{II}), 3.75-3.67 (m, 4 H, H-5'b^I, H-5'b^{II}), 3.66-3.34 (m, 16 H, H-6'a^I, H-6'a^{II}, H-6'b^I, H-6'b^{II}, CH_2O), 1.56 (m, 8 H, OCH_2CH_2), 1.25 (m, 72 H, CH_2), 0.87 (t, 12 H, $^3J = 6.6$ Hz, CH_3).

^{13}C NMR (125.7 MHz, CDCl_3) δ 161.4, 158.9 (CO), 115.7 (CF_3), 115.8, 115.6 (C-2'), 73.9, 73.3 (C-4'), 66.1, 65.7 (CH_2O), 65.4, 64.3 (C-5'), 41.8, 40.9 (C-6'), 32.8, 31.9, 29.6, 29.5, 25.7, 22.7 (CH_2), 14.1 (CH_3).

ESIMS m/z 406.3 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$). Anal. Calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{F}_3\text{NO}_4$: C, 56.38; H, 8.41; N, 3.65. Found: C, 56.15; H, 8.31; N, 3.34.

(±)-(2-Butyloxy-[1,3]dioxolan-4-yl)methylamine (55). To a solution of **55** (1.9 g, 7.0 mmol) in THF (11 mL), a solution of 4% aqueous NaOH (16 mL) was added at 0 °C and the mixture reaction was stirred for 4 h at rt. The aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 (3 x 70 mL) and the combined organic layers were washed with brine (50 mL), dried (K_2CO_3), filtered and the solvent evaporated. The residue was purified by column chromatography (9:1 CH_2Cl_2 -MeOH). Yield: 1.0 g (82%). R_f 0.57 (9:1 CH_2Cl_2 -MeOH).

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 5.81, 5.78 (s, 4 H, H-2), 4.35, 4.19 (m, 4 H, H-4), 4.14, 4.06 (m, 4 H, H-5a), 3.79, 3.71 (m, 4 H, H-5b), 3.54 (m, 8 H, CH_2O), 2.95-2.73 (m, 8 H, H-6a, H-6b), 1.59 (m, 8 H, OCH_2CH_2), 1.37 (m, 8 H, CH_2), 0.90 (m, 12 H, CH_3).

^{13}C NMR (125.7 MHz, CDCl_3 , 313 K) δ 115.9, 115.5 (C-2), 78.2 (C-4), 66.2, 66.1 (C-5), 64.8, 64.7 (CH_2O), 44.8, 44.4 (C-6), 31.6, 31.0, 19.4, 19.3 (CH_2), 13.9 (CH_3).

ESIMS m/z 176.0 ($[\text{M} + \text{H}]^+$). Anal. Calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NO}_3$: C, 54.84; H, 9.78; N, 7.99. Found: C, 54.58; H, 9.61; N, 7.74.

(±)-(2-Octyloxy-[1,3]dioxolan-4-yl)methylamine (56). Compound **56** was obtained from **51** (2.4 g, 7.0 mmol) following the procedure described for **55**. Column chromatography (9:1 CH₂Cl₂-MeOH). Yield: 0.92 g (57%). *R_f* 0.22 (9:1 CH₂Cl₂-MeOH).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 5.81, 5.78 (s, 4 H, H-2), 4.33, 4.28 (m, 4 H, H-4), 4.15, 4.06 (m, 4 H, H-5a^I, H-5a^{II}), 3.79, 3.71 (m, 4 H, H-5b^I, H-5b^{II}), 3.54 (m, 8 H, CH₂O), 2.95-2.73 (m, 8 H, H-6a^I, H-6a^{II}, H-6b^I, H-6b^{II}), 1.65 (m, 8 H, OCH₂CH₂), 1.30 (m, 40 H, CH₂), 0.90 (m, 12 H, CH₃).

¹³C NMR (125.7 MHz, CDCl₃, 313 K) δ 115.9, 115.7 (C-2), 78.3 (C-4), 66.3, 66.1 (C-5), 65.2, 65.0 (CH₂O), 44.9, 44.5 (C-6), 31.9, 29.6, 29.4, 29.3, 26.2, 22.7 (CH₂), 14.2 (CH₃).

ESIMS *m/z* 232.1 ([M + H]⁺). Anal. Calcd for C₁₂H₂₅NO₃: C, 62.30; H, 10.89; N, 6.05. Found: C, 62.17; H, 10.77; N, 6.10.

(4R)-(2-Octyloxy-[1,3]dioxolan-4-yl)methylamine (57). Compound **57** was obtained from **52** (2.4 g, 7.0 mmol) following the procedure described for **55**. Column chromatography (9:1 CH₂Cl₂-MeOH). Yield: 0.97 g (60%). *R_f* 0.47 (9:1 CH₂Cl₂-MeOH).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 5.82, 5.79 (s, 2 H, H-2), 4.31, 4.20 (m, 2 H, H-4), 4.15, 4.04 (m, 2 H, H-5a^I, H-5a^{II}), 3.78 (m, 1 H, H-5b^I), 3.69 (dd, 1 H, *J*_{5a,5b} = 7.8 Hz, *J*_{5b,4} = 5.7 Hz, H-5b^{II}), 3.51 (m, 4 H, CH₂O), 2.92-2.74 (m, 4 H, H-6a^I, H-6a^{II}, H-6b^I, H-6b^{II}), 1.58 (m, 4 H, OCH₂CH₂), 1.26 (m, 20 H, CH₂), 0.90 (t, 6 H, ³*J* = 6.9 Hz, CH₃).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃) δ 115.7, 115.4 (C-2), 78.1, 76.7 (C-4), 66.1, 65.9 (C-5), 65.0, 64.9 (CH₂O), 44.7, 44.3 (C-6), 31.8, 29.5, 29.3, 29.2, 26.1, 22.6 (CH₂), 14.0 (CH₃).

ESIMS *m/z* 232.1 ([M + H]⁺). HRMS C₁₂H₂₆NO₃ found 232.1916, (M + H)⁺ requires 232.1913.

(4S)-(2-Octyloxy-[1,3]dioxolan-4-yl)methylamine (58). Compound **58** was obtained from **53** (2.4 g, 7.0 mmol) following the procedure described for **55**. Column chromatography (9:1 CH₂Cl₂-MeOH). Yield: 0.86 g (53%). *R_f* 0.47 (9:1 CH₂Cl₂-MeOH).

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 5.82, 5.79 (s, 2 H, H-2), 4.32, 4.16 (m, 2 H, H-4), 4.15, 4.04 (m, 2 H, H-5a^I, H-5a^{II}), 3.78 (m, 1 H, H-5b^I), 3.69 (dd, 1 H, *J*_{5a,5b} = 7.5 Hz, *J*_{5b,4} = 5.4 Hz, H-5b^{II}), 3.51 (m, 4 H, CH₂O), 2.93-2.74 (m, 4 H, H-6a^I, H-6a^{II}, H-6b^I, H-6b^{II}), 1.58 (m, 4 H, OCH₂CH₂), 1.26 (m, 20 H, CH₂), 0.89 (t, 6 H, ³*J* = 6.9 Hz, CH₃).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃) δ 115.7, 115.4 (C-2), 78.1, 76.7 (C-4), 66.1, 65.9 (C-5), 65.0, 64.9 (CH₂O), 44.7, 44.3 (C-6), 31.8, 29.5, 29.3, 29.2, 26.1, 22.6 (CH₂), 14.0 (CH₃).

ESIMS *m/z* 254.0 ([M + H]⁺). HRMS C₁₂H₂₆NO₃ found 232.1905, [M + H]⁺ requires 232.1913.

(±)-(2-Dodecyloxy-[1,3]dioxolan-4-yl)methylamine (59). Compound **59** was obtained from **54** (2.8 g, 7.0 mmol) following the procedure described for **55**. Column chromatography (9:1 CH₂Cl₂-MeOH). Yield: 0.95 g (44%). *R_f* 0.55 (9:1 CH₂Cl₂-MeOH).

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 5.81, 5.78 (s, 4 H, H-2), 4.35, 4.28 (m, 4 H, H-4), 4.15, 4.05 (m, 4 H, H-5a), 3.79, 3.70 (m, 4 H, H-5b), 3.52 (m, 8 H, CH₂O), 2.95-2.73 (m, 8 H, H-6a, H-6b), 1.65 (m, 8 H, OCH₂CH₂), 1.30 (m, 72 H, CH₂), 0.88 (m, 12 H, CH₃).

¹³C NMR (125.7 MHz, CDCl₃, 313 K) δ 115.8, 115.5 (C-2), 78.3 (C-4), 66.2, 66.1 (C-5), 65.2, 65.0 (CH₂O), 44.8, 44.4 (C-6), 32.0, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 26.2, 22.8 (CH₂), 14.2 (CH₃).

ESIMS *m/z* 310.3 ([M + H]⁺). Anal. Calcd for C₁₂H₂₅NO₃: C, 66.86; H, 11.57; N, 4.87. Found: C, 66.52; H, 11.39; N, 4.58.

(±)-(2-Butyloxy-[1,3]dioxolan-4-yl)methylisothiocyanate (60). To a solution of **60** (1.04 g, 5.93 mmol) in EtOH (6.8 mL), CS₂ (4.5 g, 59 mmol) and Et₃N (599 mg, 5.93 mmol) were added and the mixture reaction was stirred for 30 min at room temperature.

Then, a solution of Boc_2O (1.28 g, 5.87 mmol) in EtOH (1.6 mL) and DMAP (15 mg, 0.12 mmol) were added at 0 °C. The resulting mixture was stirred for 5 min at 0 °C and for 40 min at rt. H_2O and CH_2Cl_2 were added (100 mL, 1:1), the phases were separated and the aqueous phase was extracted with CH_2Cl_2 (2 x 50 mL). The combined organic phases were washed with brine (100 mL), dried (MgSO_4), filtered and the solvent was eliminated. The obtained residue was purified by column chromatography (1:6 EtOAc-cyclohexane). Yield: 1.29 g (quant.). R_f 0.41 (1:6 EtOAc-cyclohexane).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 5.87, 5.81 (s, 4 H, H-2), 4.48, 4.36 (m, 4 H, H-4), 4.20, 4.13 (m, 4 H, H-5a), 3.90-3.77 (m, 4 H, H-5b), 3.71-3.77 (m, 8 H, H-6a, H-6b), 3.59-3.50 (m, 8 H, CH_2O), 1.58 (m, 8 H, OCH_2CH_2), 1.25 (m, 8 H, CH_2), 0.87 (m, 12 H, CH_3).

^{13}C NMR (100.6 MHz, CDCl_3 , 313 K) δ 133.2 (NCS), 116.2, 115.8 (C-2), 73.9, 73.1 (C-4), 66.5, 65.8 (C-5), 65.2, 65.0 (CH_2O), 48.1, 47.3 (C-6), 31.5, 19.3 (CH_2), 13.8 (CH_3).

ESIMS m/z 240.0 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$). Anal. Calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{23}\text{NO}_3\text{S}$: C, 49.75; H, 6.96; N, 6.45; S, 14.76. Found: C, 49.83; H, 7.06; N, 6.23; S, 14.41.

(\pm)-(2-Octyloxy-[1,3]dioxolan-4-yl)methylisothiocyanate (61). Compound **61** was obtained from **56** (1.4 g, 5.93 mmol) following the procedure described for **60**. Column chromatography (1:6 EtOAc-cyclohexane). Yield: 1.49 g (92%). R_f 0.48 (1:9 EtOAc-cyclohexane).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 5.88, 5.82 (s, 4 H, H-2), 4.49, 4.35 (m, 4 H, H-4), 4.20, 4.13 (m, 4 H, H-5a), 3.91-3.77 (m, 4 H, H-5b), 3.69-3.58 (m, 8 H, H-6a, H-6b), 3.56-3.50 (m, 8 H, CH_2O), 1.58 (m, 8 H, OCH_2CH_2), 1.27 (m, 40 H, CH_2), 0.87 (m, 12 H, CH_3).

^{13}C NMR (100.6 MHz, CDCl_3 , 313 K) δ 133.2 (NCS), 116.3, 115.9 (C-2), 74.0, 73.2 (C-4), 66.6, 65.8 (C-5), 65.6, 65.5 (CH_2O), 48.1, 47.3 (C-6), 31.9, 29.6, 29.4, 29.3, 26.2 (CH_2), 14.2 (CH_3).

ESIMS m/z 296.1 ($[M + Na]^+$). Anal. Calcd for $C_{13}H_{23}NO_3S$: C, 57.11; H, 8.48; N, 5.12; S, 11.73. Found: C, 57.20; H, 8.45; N, 5.13; S, 11.59.

(4R)-(2-Octyloxy-[1,3]dioxolan-4-yl)methylisothiocyanate (62). Compound **62** was obtained from **57** (1.4 g, 5.93 mmol) following the procedure described for **60**. Column chromatography (1:6 EtOAc-cyclohexane). Yield: 1.62 g (quant.). R_f 0.42 (1:9 EtOAc-cyclohexane). $[\alpha]_D + 22.3$ (c 1.0, CH_2Cl_2).

1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 5.88, 5.82 (s, 2 H, H-2), 4.49, 4.35 (m, 2 H, H-4), 4.20, 4.13 (dd, 1 H, $J_{5a,5b} = 8.4$ Hz, $J_{5a,4} = 6.8$ Hz, H-5a^I, H-5a^{II}), 3.91-3.77 (m, 2 H, H-5b^I, H-5b^{II}), 3.69-3.58 (m, 4 H, H-6a^I, H-6a^{II}, H-6b^I, H-6b^{II}), 3.56-3.50 (m, 4 H, CH_2O), 1.58 (m, 4 H, OCH_2CH_2), 1.27 (m, 20 H, CH_2), 0.87 (t, 6 H, $^3J_{H,H} = 6.9$ Hz, CH_3).

^{13}C NMR (75.5 MHz, $CDCl_3$) δ 133.2 (NCS), 116.3, 115.7 (C-2), 73.8, 73.1 (C-4), 66.5, 65.8 (C-5), 65.6, 65.3 (CH_2O), 48.0, 47.2 (C-6), 31.9, 29.6, 29.4, 29.3, 26.2 (CH_2), 14.0 (CH_3).

ESIMS m/z 296.1 ($[M + Na]^+$). HRMS $C_{13}H_{24}NO_3S$ found 274.1469, $[M + H]^+$ requires 274.1477.

(4S)-(2-Octyloxy-[1,3]dioxolan-4-yl)methylisothiocyanate (63). Compound **63** was obtained from **58** (1.4 g, 5.93 mmol) following the procedure described for **60**. Column chromatography (1:6 EtOAc-cyclohexane). Yield: 1.47 g (91%). R_f 0.36 (1:9 EtOAc-cyclohexane). $[\alpha]_D - 26.2$ (c 1.0, CH_2Cl_2).

1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ 5.88, 5.82 (s, 2 H, H-2), 4.49, 4.35 (m, 2 H, H-4), 4.20, 4.13 (dd, 1 H, $J_{5a,5b} = 8.4$ Hz, $J_{5a,4} = 6.8$ Hz, H-5a^I, H-5a^{II}), 3.91-3.77 (m, 2 H, H-5b^I, H-5b^{II}), 3.69-3.58 (m, 4 H, H-6a^I, H-6a^{II}, H-6b^I, H-6b^{II}), 3.56-3.50 (m, 4 H, CH_2O), 1.58 (m, 4 H, OCH_2CH_2), 1.27 (m, 20 H, CH_2), 0.87 (t, 6 H, $^3J_{H,H} = 6.9$ Hz, CH_3).

^{13}C NMR (75.5 MHz, CDCl_3) δ 133.2 (NCS), 116.2, 115.7 (C-2), 73.8, 73.1 (C-4), 66.4, 65.7 (C-5), 65.4, 65.3 (CH_2O), 48.0, 47.2 (C-6), 31.8, 29.6, 29.4, 29.3, 26.2, 26.0, 22.6 (CH_2), 14.0 (CH_3).

ESIMS m/z 296.1 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$). HRMS $\text{C}_{13}\text{H}_{24}\text{NO}_3\text{S}$ found 274.1471, $[\text{M} + \text{H}]^+$ requires 274.1477.

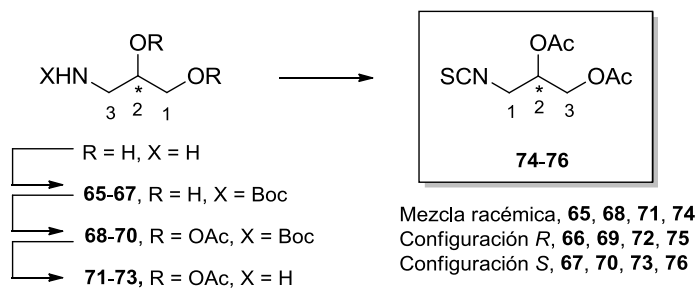
(\pm)-(2-Dodecyloxy-[1,3]dioxolan-4-yl)methylisothiocyanate (64). Compound **64** was obtained from **59** (1.8 g, 5.93 mmol) following the procedure described for **60**. Column chromatography (1:6 EtOAc-cyclohexane). Yield: 1.40 g (72%). R_f 0.36 (1:9 EtOAc-cyclohexane).

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 5.88, 5.82 (s, 4 H, H-2), 4.49, 4.36 (m, 4 H, H-4), 4.20, 4.13 (m, 4 H, $J_{5a,5b} = 8.5$ Hz, $J_{5a,4} = 6.8$ Hz, H-5a), 3.90-3.77 (m, 4 H, H-5b), 3.69 (dd, 4 H, $J_{6a,6b} = 14.3$ Hz, $J_{6b,4} = 6.1$ Hz, H-6a), 3.66 (dd, 4 H, $J_{6b,4} = 5.3$ Hz, H-6b), 3.58-3.50 (m, 8 H, CH_2O), 1.58 (m, 8 H, OCH_2CH_2), 1.25 (m, 72 H, CH_2), 0.87 (m, 12 H, $^3J_{\text{H,H}} = 6.1$ Hz, CH_3).

^{13}C NMR (125.7 MHz, CDCl_3 , 313 K) δ 133.2 (NCS), 116.3, 115.9 (C-2), 74.0, 73.2 (C-4), 66.6, 65.9 (C-5), 65.6, 65.5 (CH_2O), 48.1, 47.4 (C-6), 32.0, 29.8, 29.7, 29.6, 29.5, 26.2, 22.8 (CH_2), 14.3 (CH_3).

ESIMS m/z 352.2 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$). Anal. Calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{23}\text{NO}_3\text{S}$: C, 61.97; H, 9.48; N, 4.25; S, 9.73. Found: C, 62.05; H, 9.44; N, 4.14; S, 9.52.

Preparation of 2,3-di-*O*-acetylpropyl isothiocyanates.



(±)-1-*N*-(*tert*-Butoxycarbonylamino)propane-2,3-diol (65**).** To a solution of commercial (±)-3-aminopropane-1,2-diol (420 mg, 4.61 mmol) in DMF (5 mL), Et₃N (704 μL, 5.07 mmol) and di-*tert*-butoxycarbonyl-dicarbonate (Boc₂O) (1.21 g, 5.53 mmol) were added. The mixture was stirred at rt. for 15 h, under Ar atmosphere. The solvent was evaporated and the resulting residue was purified by column chromatography (9:1 → 5:1 CH₂Cl₂-MeOH). Yield: 871 mg (99%). *R_f* 0.68 (5:1 CH₂Cl₂-MeOH).

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 3.65 (m, 2 H, H-2), 3.49 (m, 4 H, H-3), 3.21 (dd, 2 H, H-1a), 3.06 (m, 2 H, H-1b), 1.44 (s, 18 H, CMe₃).

¹³C NMR (75.5 MHz, CD₃OD) δ 158.9 (CO), 80.2 (CMe₃), 72.4 (C-2), 65.0 (C-3), 44.2 (C-1), 28.7 (CMe₃).

ESIMS *m/z* 214 ([M + Na]⁺). HRMS C₈H₁₈NO₄ found 192.1235, [M + H]⁺ requires 192.1236.

(*R*)-1-*N*-(*tert*-Butoxycarbonylamino)propane-2,3-diol (66**).** Compound **66** was obtained from commercial (*R*)-3-aminopropane-1,2-diol (420 mg, 4.61 mmol) following the procedure described for **65**. Column chromatography (9:1 CH₂Cl₂-MeOH). Yield: 871 mg (99%). *R_f* 0.42 (9:1 CH₂Cl₂-MeOH).

^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ 3.64 (m, 1 H, H-2), 3.49 (m, 2 H, H-3a, H-3b), 3.20 (dd, 1 H, $J_{1a,1b} = 13.9$ Hz, $J_{1a,2} = 5.2$ Hz, H-1a), 3.06 (dd, 1 H, $J_{1b,2} = 6.5$ Hz, H-1b), 1.44 (s, 9 H, CMe_3).

^{13}C NMR (75.5 MHz, CD_3OD) δ 158.8 (CO), 80.2 (CMe_3), 72.4 (C-2), 65.0 (C-3), 44.2 (C-1), 28.7 (CMe_3).

ESIMS m/z 214 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$).

(S)-1-N-(tert-Butoxycarbonylamino)propane-2,3-diol (67). Compound **67** was obtained from commercial (S)-3-aminopropane-1,2-diol (420 mg, 4.61 mmol) following the procedure described for **65**. Column chromatography (9:1 CH_2Cl_2 -MeOH). Yield: 828 mg (94%). R_f 0.58 (9:1 CH_2Cl_2 -MeOH).

^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ 3.64 (m, 1 H, H-2), 3.49 (m, 2 H, H-3a, H-3b), 3.19 (dd, 1 H, $J_{1a,1b} = 13.9$ Hz, $J_{1a,2} = 5.2$ Hz, H-1a), 3.06 (dd, 1 H, $J_{1b,2} = 6.5$ Hz, H-1b), 1.44 (s, 9 H, CMe_3).

^{13}C NMR (75.5 MHz, CD_3OD) δ 158.8 (CO), 80.2 (CMe_3), 72.3 (C-2), 65.0 (C-3), 44.2 (C-1), 28.7 (CMe_3).

ESIMS m/z 214 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$).

(±)-2,3-Di-O-acetyl-1-N-((tert-butoxycarbonyl)amino)propane (68). To a solution of **65** (783 mg, 4.10 mmol), Ac_2O -py (1:1, 12 mL) was added and the mixture reaction was stirred at rt for 24 h. The reaction mixture was quenched with H_2O (10 mL), diluted with CH_2Cl_2 (30 mL) and washed with 2M HCl aq (15 mL) and saturated aq solution of NaHCO_3 (15 mL). The organic fractions were dried (MgSO_4) and the solvent was concentrated to give the residue, which was coevaporated several times with toluene and purified by column chromatography (1:2 EtOAc-cyclohexane). Yield: 1.15 g (quant.). R_f 0.45 (1:2 AcOEt- cyclohexane).

^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ 5.06 (m, 2 H, H-2), 4.27 (dd, 2 H, $J_{3a,3b} = 12.0$ Hz, $J_{3a,2} = 4.0$ Hz, H-3a), 4.06 (dd, 2 H, $J_{3b,2} = 3.0$ Hz, H-3b), 3.36 (d, 2 H, $J_{1a,2} = 4.9$ Hz, H-1a), 3.20 (dd, 2 H, $J_{\text{gem}} = 14.4$ Hz, $J_{1b,2} = 6.7$ Hz, H-1b), 2.04 (s, 12 H, CH_3CO), 1.43 (s, 18 H, CMe_3).

^{13}C NMR (75.5 MHz, CD_3OD) δ 172.4, 172.1 (CO ester), 158.7 (CO carbamate), 80.3 (CMe_3), 72.0 (C-2), 64.1 (C-3), 41.3 (C-1), 28.8 (CMe_3), 20.9, 20.6 (CH_3CO).

ESIMS m/z 298 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$). HRMS $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{NO}_6$ found 276.1447, $[\text{M} + \text{H}]^+$ requires 276.1447.

(*R*)-2,3-Di-*O*-acetyl-1-*N*-(*tert*-butoxycarbonylamino)propane (69). Compound **69** was obtained from **66** (783 mg, 4.10 mmol) following the procedure described for **68**. Column chromatography (1:2 EtOAc-cyclohexane). Yield: 1.15 g (quant.). R_f 0.51 (1:2 EtOAc-cyclohexane). $[\alpha]_D + 1.4$ (c 1.0, MeOH).

^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ 5.06 (m, 1 H, H-2), 4.27 (dd, 1 H, $J_{3a,3b} = 12.0$ Hz, $J_{3a,2} = 3.7$ Hz, H-3a), 4.06 (dd, 1 H, $J_{3b,2} = 6.1$ Hz, H-3b), 3.36 (d, 1 H, $J_{1a,2} = 4.9$ Hz, H-1a), 3.20 (dd, 1 H, $J_{1a,1b} = 14.3$ Hz, $J_{1b,2} = 6.6$ Hz, H-1b), 2.04 (s, 6 H, CH_3CO), 1.43 (s, 9 H, CMe_3).

^{13}C NMR (75.5 MHz, CD_3OD) δ 172.4, 172.1 (CO ester), 158.4 (CO carbamate), 80.3 (CMe_3), 72.0 (C-2), 64.1 (C-3), 41.3 (C-1), 28.7 (CMe_3), 20.8, 20.5 (CH_3CO).

ESIMS m/z 298 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$).

(*S*)-2,3-Di-*O*-acetyl-1-*N*-(*tert*-butoxycarbonylamino)propane (70). Compound **70** was obtained from **67** (783 mg, 4.10 mmol) following the procedure described for **68**. Column chromatography (1:2 EtOAc-cyclohexane). Yield: 1.15 g (quant.). R_f 0.51 (1:2 EtOAc-cyclohexane). $[\alpha]_D - 1.1$ (c 1.0, MeOH).

^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ 5.06 (m, 1 H, H-2), 4.27 (dd, 1 H, $J_{3a,3b} = 12.0$ Hz, $J_{3a,2} = 3.8$ Hz, H-3a), 4.06 (dd, 1 H, $J_{3b,2} = 6.1$ Hz, H-3b), 3.36 (d, 1 H, $J_{1a,2} = 4.8$ Hz, H-

1a), 3.21 (dd, 1 H, $J_{1a,1b} = 14.4$ Hz, $J_{1b,2} = 6.6$ Hz, H-1b), 2.04 (s, 6 H, CH₃CO), 1.43 (s, 9 H, CMe₃).

¹³C NMR (75.5 MHz, CD₃OD) δ 172.4, 172.1 (CO ester), 158.4 (CO carbamate), 80.3 (CMe₃), 72.0 (C-2), 64.1 (C-3), 41.3 (C-1), 28.7 (CMe₃), 20.8, 20.5 (CH₃CO).

ESIMS m/z 298 ([M + Na]⁺).

(±)-1,2-Di-*O*-acetyl-3-aminopropane (71). A solution of **68** (829 mg, 3.01 mmol) was treated with TFA-CH₂Cl₂ (9:1, 36 mL) at 0 °C for 20 min, concentrated and coevaporated several times with CH₂Cl₂. The resulting residue was purified by column chromatography (15:1 → 9:1 CH₂Cl₂-MeOH). Yield: 527 mg (quantitative). R_f 0.41 (9:1 CH₂Cl₂-MeOH).

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 5.24 (m, 2 H, H-2), 4.39 (dd, 2 H, $J_{1a,1b} = 12.2$ Hz, $J_{1a,2} = 4.3$ Hz, H-1a), 4.12 (dd, 2 H, $J_{1b,2} = 4.8$ Hz, H-1b), 3.24 (m, 4 H, H-3a, H-3b), 2.11, 2.06 (s, 12 H, CH₃CO).

¹³C NMR (75.5 MHz, CD₃OD) δ 172.1, 171.9 (CO), 69.6 (C-2), 63.6 (C-1), 41.0 (C-3), 20.7, 20.4 (Me).

ESIMS m/z 176 ([M + H]⁺), 198 ([M + Na]⁺). HRMS: C₇H₁₄NO₄ found 176.0927, [M + H]⁺ requires 176.0923.

(*R*)-1,2-Di-*O*-acetyl-3-aminopropane (72). Compound **72** was obtained from **69** (829 mg, 3.01 mmol) following the procedure described for **71**. Column chromatography (15:1 → 9:1 CH₂Cl₂-MeOH). Yield: 506 mg (96%). R_f 0.31 (9:1 CH₂Cl₂-MeOH). $[\alpha]_D + 10.0$ (c 1.0, MeOH).

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 5.24 (m, 1 H, H-2), 4.39 (dd, 1 H, $J_{1a,1b} = 12.2$ Hz, $J_{1a,2} = 4.1$ Hz, H-1a), 4.13 (dd, 1 H, $J_{1b,2} = 4.9$ Hz, H-1b), 3.22 (m, 2 H, H-3a, H-3b), 2.11, 2.06 (s, 6 H, CH₃CO).

^{13}C NMR (75.5 MHz, CD_3OD) δ 172.1, 171.9 (CO), 69.5 (C-2), 63.6 (C-1), 41.0 (C-3), 20.6, 20.4 (Me).

ESIMS m/z 176 ($[\text{M} + \text{H}]^+$).

(S)-1,2-Di-O-acetyl-3-aminopropane (73). Compound **73** was obtained from **70** (829 mg, 3.01 mmol) following the procedure described for **71**. Column chromatography (15:1 \rightarrow 9:1 CH_2Cl_2 -MeOH). Yield: 527 mg (quant.). R_f 0.34 (9:1 CH_2Cl_2 -MeOH). $[\alpha]_{\text{D}} - 8.7$ (c 1.0, MeOH).

^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ 5.24 (m, 1 H, H-2), 4.39 (dd, 1 H, $J_{1a,1b} = 12.2$ Hz, $J_{1a,2} = 4.1$ Hz, H-1a), 4.13 (dd, 1 H, $J_{1b,2} = 4.9$ Hz, H-1b), 3.22 (m, 2 H, H-3a, H-3b), 2.11, 2.06 (s, 6 H, CH_3CO).

^{13}C NMR (75.5 MHz, CD_3OD) δ 172.1, 171.9 (CO), 69.5 (C-2), 63.6 (C-1), 41.0 (C-3), 20.6, 20.4 (Me).

ESIMS m/z 176 ($[\text{M} + \text{H}]^+$).

(\pm)-2,3-Di-O-acetyl-1-propylisothiocyanate (74). To a solution of **71** (280 mg, 1.60 mmol) in CH_2Cl_2 - H_2O (1:1, 14 mL), CaCO_3 (1.28 g, 12.8 mmol) and CSCl_2 (490 μL , 6.4 mmol) were added and the mixture was stirred at 0 $^\circ\text{C}$ for 2 h, under Ar atmosphere. Then, the mixture was diluted with CH_2Cl_2 (7 mL) and washed with H_2O (8 mL). The aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 (3 x 7 mL). The combined organic phases were dried (MgSO_4), filtered and evaporated. The resulting residue was purified by column chromatography (1:4 \rightarrow 1:2 acetone-cyclohexane). Yield: 172 mg (49%; 89% based on recovered starting material). R_f 0.45 (1:2 acetone-cyclohexane).

^1H NMR (300 MHz, acetone- d_6) δ 5.25 (m, 2 H, H-2), 4.31 (dd, 2 H, $J_{3a,3b} = 12.0$ Hz, $J_{3a,2} = 4.5$ Hz, H-3a), 4.19 (dd, 2 H, $J_{3b,2} = 5.5$ Hz, H-3b), 3.95 (m, 4 H, H-1a, H-1b), 2.08, 2.04 (s, 12 H, CH_3CO).

^{13}C NMR (75.5 MHz, acetone- d_6) δ 170.7, 170.2 (CO), 133.5, 133.4 (NCS), 69.6 (C-2), 62.8 (C-3), 46.3 (C-1), 20.7, 20.4 (Me).

ESIMS m/z 240 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$). HRMS $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{NO}_4\text{S}$ found 218.0477, $[\text{M} + \text{H}]^+$ requires 218.0487.

(R)-2,3-Di-O-acetyl-1-propylisothiocyanate (75). Compound **75** was obtained from **72** (280 mg, 1.60 mmol) following the procedure described for **74**. Column chromatography (1:4 \rightarrow 1:2 acetone-cyclohexane). Yield: 153 mg (44%; 94% based on recovered starting material). R_f 0.42 (1:2 acetone-cyclohexane).

^1H NMR (300 MHz, acetone- d_6) δ 5.26 (m, 1 H, H-2), 4.21 (dd, 1 H, $J_{3a,3b} = 12.0$ Hz, $J_{3a,2} = 4.5$ Hz, H-3a), 4.19 (dd, 1 H, $J_{3b,2} = 4.5$ Hz, H-3b), 3.96 (m, 2 H, H-1a, H-1b), 2.09, 2.04 (s, 6 H, CH_3CO).

^{13}C NMR (75.5 MHz, acetone- d_6) δ 170.7, 170.2 (CO), 133.5, 133.4 (NCS), 69.6 (C-2), 62.8 (C-3), 46.3 (C-1), 20.7, 20.4 (Me).

ESIMS m/z 240 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$).

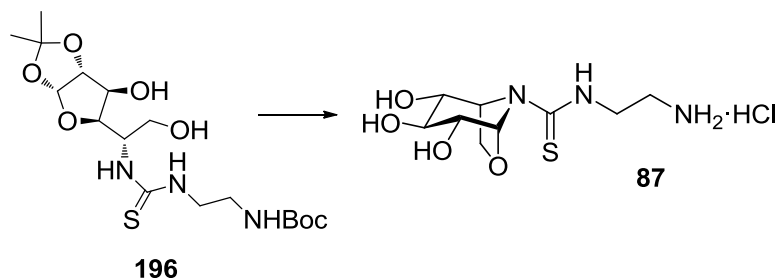
(S)-2,3-Di-O-acetyl-1-propylisothiocyanate (76). Compound **76** was obtained from **73** (280 mg, 1.60 mmol) following the procedure described for **74**. Column chromatography (1:4 \rightarrow 1:2 acetone-cyclohexane). Yield: 135 mg (39%; 84% based on recovered starting material). R_f 0.42 (1:2 acetone-cyclohexane).

^1H NMR (300 MHz, acetone- d_6) δ 5.26 (m, 1 H, H-2), 4.21 (dd, 1 H, $J_{3a,3b} = 12.0$ Hz, $J_{3a,2} = 5.5$ Hz, H-3a), 4.19 (dd, 1 H, $J_{3b,2} = 5.6$ Hz, H-3b), 3.96 (m, 2 H, H-1a, H-1b), 2.09, 2.04 (s, 6 H, CH_3CO).

^{13}C NMR (75.5 MHz, acetone- d_6) δ 170.7, 170.2 (CO), 133.5, 133.4 (NCS), 69.6 (C-2), 62.8 (C-3), 46.3 (C-1), 20.7, 20.4 (Me).

ESIMS m/z 240 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$).

Preparation of (1*S*,2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-*N*-(*N*'-2-aminoethylthiocarbamoyl)-2,3,4-trihydroxy-6-oxa-*nor*-tropane (87).

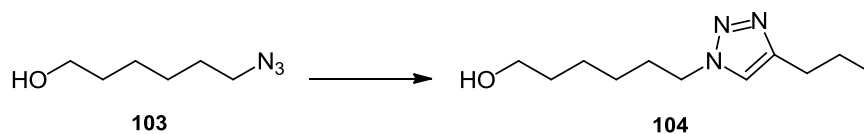


A solution of 5-deoxy-1,2-*O*-isopropylidene-5-[*N*'-(2-*tert*-butoxycarbonylamino)ethylthioureido]- β -L-idofuranose¹⁶ **196** (520 mg, 1.23 mmol) in TFA-H₂O (9:1, 4.5 mL) was stirred at 0 °C for 10 min and at rt for 1 h. The reaction mixture was concentrated and coevaporated several times with H₂O and the resulting residue was purified by column chromatography (10:1 MeCN-H₂O \rightarrow 3:1:0.5 MeCN-H₂O-NH₄OH). Yield: 243 mg (75%). *R*_f 0.38 (6:3:1 MeCN-H₂O-NH₄OH). [α]_D + 44.0 (*c* 1.0, H₂O). UV (MeOH) 249.6 nm (ϵ_{mM} 14.8).

¹H NMR (500 MHz, D₂O, 323 K) δ 6.18 (d, 1 H, $J_{1,2}$ = 1.0 Hz, H-1), 5.11 (t, 1 H, $J_{4,5}$ = $J_{5,6b}$ = 4.5 Hz, H-5), 4.38 (d, 1 H, $J_{6a,6b}$ = 8.5 Hz, H-6a), 4.15 (m, 2 H, CH₂NHCS), 4.10 (ddd, 1 H, $J_{4,6b}$ = 1.0 Hz, H-6b), 4.00 (m, 1 H, H-4), 3.87 (dd, 1 H, $J_{2,3}$ = 8.0 Hz, H-2), 3.86 (t, 1 H, $J_{3,4}$ = 8.0 Hz, H-3), 3.45 (t, 2 H, $^3J_{\text{H,H}}$ = 6.5 Hz, CH₂NHCO).

¹³C NMR (125.7 MHz, D₂O, 323 K) δ 178.9 (CS), 88.7 (C-1), 75.4 (C-3), 74.1 (C-2), 70.8 (C-4), 66.5 (C-6), 58.6 (C-5), 42.8 (CH₂NHCS), 39.5 (CH₂NH₂).

FABMS *m/z* 444 (100, [M + Na]⁺), 422 (40, [M + H]⁺). Anal. Calcd for C₉H₁₇N₃O₄S: C, 41.05; H, 6.51; N, 15.96. Found: C, 40.87; H, 6.35; N, 15.72.

Preparation of 6-(4-propyl-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)hexan-1-ol (104).

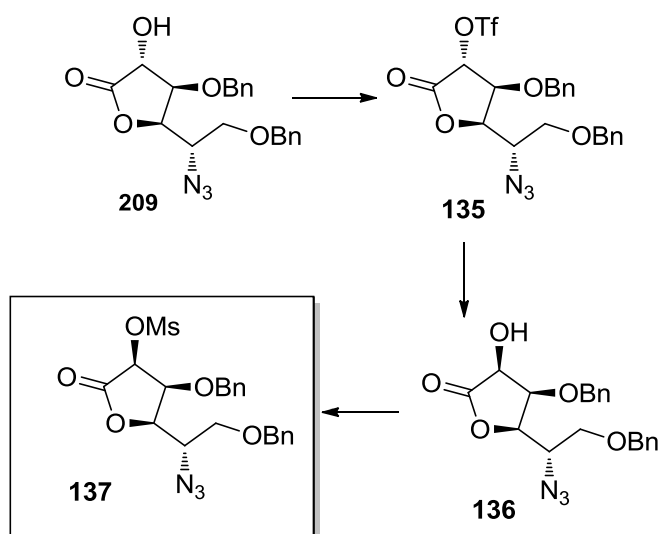
To a solution of 6-azidohexan-1-ol **103** (54 mg, 0.377 mmol) and 1-pentyne (206 mg, 3.017 mmol) in THF (4 mL) was added a solution of CuSO₄·5H₂O (9.4 mg, 0.038 mmol) and sodium ascorbate (15 mg, 0.075 mg) in water (4 mL). The mixture was stirred at rt overnight. Solvents were then evaporated and the residue was dissolved in EtOAc. The solution was washed with a 10% solution of NH₄OH to remove copper. The organic layer was dried (Na₂SO₄), filtered and evaporated. The resulting residue was purified by flash chromatography using 1:9 EtOAc-petroleum ether as eluent. Yield: 79 mg (99%). IR 3367 (OH) cm⁻¹.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 0.89 (t, 3 H, *J* = 7.3 Hz, H-11), 1.20-1.43 (m, 4 H, H-3 and H-4), 1.43-1.55 (m, 2 H, H-2), 1.62 (m, 2 H, *J* = 7.5 Hz, H-10), 1.82 (qt, 2 H, *J* = 7.3 Hz, H-5), 2.61 (t, 2 H, *J* = 7.6 Hz, H-9), 2.81 (s, 1 H, O-H), 3.56 (t, 2 H, *J* = 6.4 Hz, H-1), 4.24 (t, 2 H, *J* = 7.3 Hz, H-6), 7.23 (s, 1 H, H-7).

¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD) δ 13.7, 22.7, 25.2, 26.2, 27.6, 30.3, 32.4, 50.0, 62.2, 120.6 (C-7), 148.1 (C-8).

HRMS (ESI) *m/z* 234.158 [M + Na]⁺, calcd. for C₁₁H₂₁N₃NaO 234.158.

Preparation of 5-azido-3,6-di-*O*-benzyl-5-deoxy-2-*O*-methanesulfonyl-L-gulono-1,4-lactone (137).



5-Azido-3,6-di-*O*-benzyl-5-deoxy-2-*O*-trifluoromethanesulfonyl-L-idono-1,4-lactone (135). To a solution of 5-azido-3,6-di-*O*-benzyl-5-deoxy-L-idono-1,4-lactone **209** (610 mg, 1.59 mmol) in CH₂Cl₂ (6 mL) and pyridine (385 μ L, 4.77 mmol) was cooled to -40 $^{\circ}$ C and then trifluoromethanesulfonyl anhydride (Tf₂O) was added (348 μ L, 2.07 mmol) dropwise over 20 minutes, after the mixture stirred at -40 $^{\circ}$ C, under N₂ atmosphere, for 1 h. The mixture reaction was diluted with CH₂Cl₂ (8 mL) and washed with 2 M HCl aq (3 x 8 mL), dried (MgSO₄), concentrated and purified by flash column chromatography (cyclohexane \rightarrow 9:1 cyclohexane-EtOAc \rightarrow 7:1 \rightarrow 4:1 \rightarrow 3:1). Yield: 685 mg (84%). R_f 0.62 (2:1 cyclohexane-EtOAc). [α]_D + 64.3 (*c* 0.34, CHCl₃). ν_{\max} 2117 (N₃), 1810 (CO).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.41-7.33 (Ph), 5.82 (dd, 1 H, $J_{2,3}$ = 7.6 Hz, H-2), 4.85 (d, 1 H, J_{gem} = 11.6 Hz, CH₂Ph), 4.62-4.52 (m, 3 x CH₂Ph, H-3, H-4), 4.01 (ddd, 1 H,

H-5), 3.69 (dd, 1 H, $J_{6a,6b} = 9.3$ Hz, $J_{5,6a} = 7.3$ Hz, H-6a), 3.61 (dd, 1 H, $J_{5,6b} = 6.6$ Hz, H-6b).

^{13}C NMR (100.6 MHz, CDCl_3) δ 165.7 (C-1), 137.0-127.8 (Ph), 81.4 (C-2), 77.2 (C-4 or C-3), 76.1 (C-4 or C-3), 73.8, 72.7 (CH_2Ph), 68.9 (C-6), 58.8 (C-5).

ESIMS m/z 538 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$), 550 ($[\text{M} + \text{Cl}]^-$). ESIHRMS $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{F}_3\text{N}_3\text{NaO}_7\text{S}$ found 538.0867, $[\text{M} + \text{Na}]^+$ requires 538.0866.

5-Azido-3,6-di-*O*-benzyl-5-deoxy-L-gulono-1,4-lactone (136). To a solution of **135** (656 mg, 1.27 mmol) in DMF (3 mL), sodium trifluoroacetate (362 mg) was added and the reaction mixture was stirred at rt for 2 h. The mixture reaction was diluted with EtOAc (30 mL) and washed with saturated NaHCO_3 (30 mL) and the aqueous phase extracted with EtOAc (2 x 30 mL). The organic fractions were dried (MgSO_4), concentrated and purified by flash column chromatography (cyclohexane \rightarrow 9:1 cyclohexane-EtOAc \rightarrow 7:1 \rightarrow 4:1 \rightarrow 3:1 \rightarrow 2:1). Yield: 444 mg (90%). R_f 0.27 (2:1 cyclohexane-EtOAc). $[\alpha]_D + 11.79$ (c 0.81, CHCl_3). ν_{max} (thin film) 3410 (s, OH), 2099 (s, N_3), 1785 (s, CO).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.38-7.24 (Ph), 4.84 (d, 1 H, $J_{\text{gem}} = 11.1$ Hz, CH_2Ph), 4.54 (m, 3 H, H-2, H-4, CH_2Ph), 4.34 (d, 1 H, $J_{\text{gem}} = 11.1$ Hz, CH_2Ph), 4.16 (dd, 1 H, $J_{2,3} = 4.5$ Hz, $J_{3,4} = 3.3$ Hz, H-3), 3.93 (ddd, 1 H, $J_{6a,6b} = 8.8$ Hz, $J_{5,6b} = 4.5$ Hz, $J_{5,6a} = 3.3$ Hz, H-5), 3.53 (dd, 1 H, $J_{6a,6b} = 10.4$ Hz, H-6a), 3.44 (dd, 1 H, H-6b), 3.06 (s, 1 H, OH).

^{13}C NMR (100.6 MHz, CDCl_3) δ 174.55 (C-1), 137.1-128.1 (Ph), 79.3 (C-2 or C-4), 75.4 (C-3), 74.2, 73.6 (CH_2Ph), 71.9 (C-2 or C-4), 68.1 (C-6), 60.2 (C-5).

ESIMS m/z 406 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$), 789 ($[2\text{M} + \text{Na}]^+$). ESIHRMS $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{NaO}_5$ found 406.1362, $[\text{M} + \text{Na}]^+$ requires 406.1373.

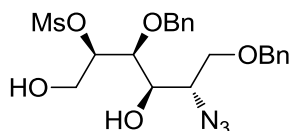
5-Azido-3,6-di-*O*-benzyl-5-deoxy-2-*O*-methanesulfonyl-L-gulono-1,4-lactone (137). To a solution of **136** (91 mg, 0.237 mmol) in pyridine (1.5 mL), mesil chloride (27 μ L) was added at 0 °C and the reaction mixture was stirred at rt, under N₂ atmosphere, until conversion starting material. The solvent was coevaporated with toluene and the residue was purified by flash column chromatography (cyclohexane \rightarrow 9:1 cyclohexane-EtOAc \rightarrow 4:1 \rightarrow 3:1 \rightarrow 2:1). Yield: 104 mg (96 %). *R_f* 0.55 (2:1 cyclohexane-EtOAc). $[\alpha]_D + 2.5$ (c 0.44, CHCl₃). ν_{\max} 2101 (N₃), 1800 (CO).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.38-7.24 (Ph), 5.39 (d, 1 H, $J_{2,3} = 4.6$ Hz, H-2), 4.85 (d, 1 H, $J_{\text{gem}} = 11.1$ Hz, CH₂Ph), 4.59 (dd, 1 H, $J_{4,5} = 8.9$ Hz, $J_{3,4} = 3.2$ Hz, H-4), 4.51 (d, 1 H, $J_{\text{gem}} = 11.8$ Hz, CH₂Ph), 4.31 (d, 1 H, $J_{\text{gem}} = 11.8$ Hz, CH₂Ph), 4.27 (d, 1 H, $J_{\text{gem}} = 11.8$ Hz, CH₂Ph), 4.26 (dd, 1 H, H-3), 3.92 (ddd, 1 H, $J_{6a,6b} = 8.9$ Hz, $J_{5,6b} = 4.0$ Hz, $J_{5,6a} = 3.0$ Hz, H-5), 3.49 (dd, 1 H, $J_{6a,6b} = 10.4$ Hz, H-6a), 3.38 (dd, 1 H, H-6b), 3.35 (s, 3 H, Me).

¹³C NMR (100.6 MHz, CDCl₃) δ 168.9 (C-1), 136.9-128.1 (Ph), 79.6 (C-4), 76.0 (C-2), 74.7 (C-3), 74.3, 73.6 (CH₂Ph), 67.7 (C-6), 60.0 (C-5), 40.0 (Me).

ESIMS *m/z* 945 ([2M + Na]⁺). ESIHRMS C₂₁H₂₃N₃NaO₇S found 484.1144, [M + Na]⁺ requires 484.1149.

Preparation of 2-azido-1,4-di-*O*-benzyl-2-deoxy-5-*O*-methanesulfonyl-D-glucitol (138).



To a solution of **137** (100 mg, 0.217 mmol) in EtOH (5 mL) was cooled to -30 °C, NaBH₄ (41 mg, 1.08 mmol) was added and the mixture reaction was stirred at -30 °C, under N₂ atmosphere, for 1h. The reaction mixture was quenched with glacial AcOH (until pH 6). EtOAc (30 mL) and saturated NaHCO₃ (20 mL) were added and extracted

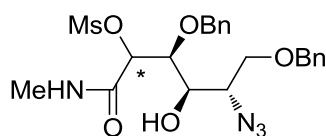
with (2 x 30 mL) and the organic fractions were dried (MgSO₄), concentrated and purified by flash column chromatography (9:1 cyclohexane-EtOAc → 7:1 → 4:1 → 3:1 → 2:1 → 1:1 → 1:2 → 1:4). Yield: 83 mg (82%). *R_f* 0.52 (1:1 cyclohexane-EtOAc). [α]_D + 4.8 (*c* 0.47, CHCl₃). ν_{\max} (thin film): 2098 (s, N₃).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.36-7.304 (Ph), 4.85 (m, 1 H, H-2) 4.76 (d, 1 H, *J*_{gem} = 11.6 Hz, CH₂Ph), 4.55 (d, 1 H, *J*_{gem} = 9.5 Hz, CH₂Ph), 4.52 (d, 1 H, *J*_{gem} = 9.5 Hz, CH₂Ph), 4.45 (d, 1 H, *J*_{gem} = 11.6 Hz, CH₂Ph), 4.05 (dd, 1 H, *J*_{1a,1b} = 12.7 Hz, *J*_{1a,2} = 3.0 Hz, H-1a), 3.92 (t, 1 H, *J*_{2,3} = *J*_{3,4} = 3.8 Hz, H-3), 3.84 (dd, 1 H, *J*_{1b,2} = 6.8 Hz, H-1b), 3.84 (dd, 1 H, *J*_{4,5} = 6.3 Hz, H-4), 3.64 (ddd, 1 H, *J*_{5,6b} = 6.6 Hz, *J*_{5,6a} = 3.5 Hz, H-5), 3.56 (dd, 1 H, *J*_{6a,6b} = 10.4 Hz, H-6a), 3.44 (dd, 1 H, H-6b), 3.14 (s, 3 H, Me).

¹³C NMR (100.6 MHz, CDCl₃) δ 138.1-127.8 (Ph), 84.7 (C-2), 78.9 (C-3), 74.1, 73.3 (CH₂Ph), 71.0 (C-4), 69.7 (C-6), 63.8 (C-5), 60.6 (C-1), 37.4 (Me).

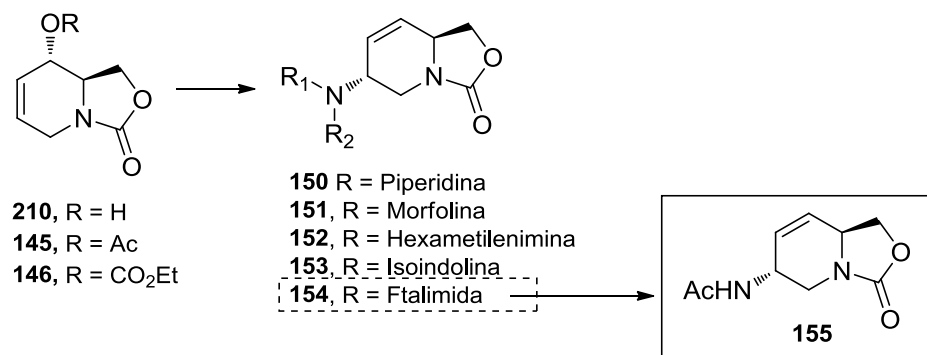
ESIMS *m/z* 488 ([M + Na]⁺), 953 ([2M + Na]⁺). ESIHRMS C₂₁H₂₇N₃NaO₇S found 488.1462, [M + Na]⁺ requires 488.1448.

Preparation of methyl 5-Azido-3,6-di-*O*-benzyl-5-deoxy-2-*O*-methanesulfonyl-L-gulonamide (139).



To a solution of **137** (132 mg, 0.286 mmol) in dioxane (6 mL), MeNH₂ (106 μ L, 0.858 mmol) was added and the mixture reaction was stirred at rt, under nitrogen atmosphere, overnight. The reaction mixture was concentrated to dryness, coevaporated with CH₂Cl₂ and purified by flash column chromatography (9:1 cyclohexane-EtOAc → 7:1 → 4:1 → 3:1 → 2:1 → 1:1). Yield: 140 mg (99%). *R_f* 0.31 (1:1 cyclohexane-EtOAc). Mixture of epimers 1:1.

Preparation of *N*-((6*R*,8*aS*)-3-Oxo-3,5,6,8*a*-tetrahydro-1*H*-oxazolo[3,4-*a*]pyridin-6-yl)acetamide (155).



(8*S*,8*aR*)-3-Oxo-1,5,8,8*a*-tetrahydro-3*H*-oxazolo[3,4-*a*]pyridin-8-yl acetate (145). To a 25 mL round bottom flask were added product **210** (257 mg, 1.7 mmol), DMAP (31 mg, 0.25 mmol) and 10 mL of CH₂Cl₂. Over this solution Et₃N (0.47 mL, 3.3 mmol) was added. After five minutes of vigorous stirring, Ac₂O (0.4 mL, 4.1 mmol) was added drop wise and the solution was stirred for 16 h at rt. The crude was treated adding 10 mL of 1 M HCl and extracted with CH₂Cl₂ (3 x 5ml), dried with MgSO₄ and purified by chromatography on silica gel using hexane-EtOAc and increasing the polarity ratio from 0 to 100% EtOAc to give **145** as a white solid. Yield: 322 mg (98 %). *R_f* 0.45 (1:2 hexane-EtOAc). [α]_D - 34.9 (*c* 0.5, CHCl₃). Mp 56 °C. *v*_{max} (thin film) 2921, 1752, 1653, 1478, 1420, 1389, 1371, 1234 cm⁻¹.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 7.36-75.92 (m, 1 H), 5.75 (m, 1 H), 5.23 (m, 1 H), 4.50 (dd, 1 H, *J* = 9.5, 8.0 Hz), 4.36 (dd, 1 H, *J* = 9.5, 5.0 Hz), 4.15 (m, 1 H), 3.70 (m, 2 H), 2.11 (s, 3 H).

¹³C NMR (75.5 MHz, CDCl₃) δ 170.3 (CO), 156.4 (CO), 126.1 (CH), 125.3 (CH), 69.1 (CH), 67.5 (CH₂), 54.2 (CH), 40.5 (CH₂), 20.8 (CH₃).

ESMS m/z 197 (M, 20%), 198 (M + 1, 17%), 215 (M + 18, 100%). Anal. Calcd. For $C_7H_9NO_4$: C, 54.82; H, 5.62; N, 7.10; found C, 54.49; H, 5.55; N, 7.17.

Ethyl ((8S,8aR)-3-oxo-1,5,8,8a-tetrahydro-3H-oxazolo[3,4-a]pyridin-8-yl) carbonate (146). To a solution of compound **210** (754 mg, 4.8 mmol) in 28 mL of CH_2Cl_2 was added pyridine (1.60 mL, 19.9 mmol) and ethyl chloroformate (1.17 mL, 12.1 mmol) dropwise. The solution was allowed to stir for 5 h and then treated with H_2O (10 mL), extracted with CH_2Cl_2 (3 x 10 mL), dried over $MgSO_4$ and purified by chromatography on silica gel using hexane-EtOAc and increasing the polarity ratio from 0 to 100% ethyl acetate to give **146** as a pale yellow solid. Yield: 988 mg (90 %). R_f 0.45 (1:1 hexane-EtOAc). $[\alpha]_D - 2.34$ (c 0.5, $CHCl_3$). Mp 82-83 °C. ν_{max} (thin film) 1744, 1422, 1370, 1252, 1082, 1007 cm^{-1} .

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 5.87 (m, 1 H, $J = 10.0, 2.0$ Hz), 5.80 (dq, 1 H, $J = 10.0, 2.0$ Hz), 5.07 (m, 1 H, $J = 8.0, 2.0$ Hz), 4.50 (dd, 1 H, $J = 9.0, 8.0$ Hz), 4.36 (dd, 1 H, $J = 9.0, 5.0$ Hz), 4.20 (q, 2 H, $J = 7.0$ Hz), 4.10 (dq, 1 H, $J = 19.0, 3.0$ Hz), 3.72 (dt, 1 H, $J = 8.0, 5.0$ Hz), 3.65 (dq, 1 H, $J = 19.0, 3.0$ Hz), 1.29 (t, 3 H, $J = 7.0$ Hz).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 156.8 (CO), 154.4 (CO), 126.4 (CH), 124.9 (CH), 72.1 (CH), 67.3 (CH_2), 64.6 (CH_2), 53.9 (CH), 40.5 (CH_2), 14.0 (CH_3).

HRMS (ES) m/z calcd. for $C_{10}H_{14}NO_5$ 228.08665, found 228.08663. Anal. Calcd. For $C_{10}H_{13}NO_5$: C, 52.86; H, 5.77; N, 6.16; found C, 53.03; H, 5.91; N, 6.12.

General procedure for allylic palladium substitution. To a solution of starting material (0.45 mmol) in 2 mL of THF in a flame-dried Schlenk flask, was added via canula a solution of $[Pd(\mu^3-C_3H_5)Cl]_2$ (0.03 mmol, 7.5 %) and dppe (0.07 mmol, 0.15%) in 1 mL of THF prepared in a flame-dried round bottom flask. After 5 min, the nucleophile (1.32 mmol) was added in one portion via syringe or as solid depending on the reagent. The mixture was stirred for 1-20 h until no starting material was detected by

TLC. The solvent was eliminated in vacuo and the obtained crude products purified by flash column chromatography on silica gel using hexane-EtOAc and increasing the polarity ratio.

(6*R*,8*aS*)-6-(Piperidin-1-yl)-1,5,6,8*a*-tetrahydro-3*H*-oxazolo[3,4-*a*]pyridin-3-one (150). General procedure was carried out with **145** (120 mg, 0.7 mmol), [Pd(μ^3 -C₃H₅)Cl]₂ (51 mg, 0.05 mmol), dppe (41 mg, 0.10 mmol) and piperidine (0.2 mL, 2.0 mmol) and THF (20 mL). After 3 h, workup and purification by column chromatography using Et₃N (2.5 % v/v) with hexane-EtOAc increasing polarity ratio from 0 to 100% EtOAc to give **150** as a white solid. Yield: 113 mg (88%). *R_f* 0.15 (1:2 hexane-EtOAc). [α]_D - 8.1 (*c* 1.1, CHCl₃). Mp 47-49 °C. ν_{\max} (thin film) 2936, 2855, 1748, 1410, 1227, 1151, 1121, 1061 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.95 (dd, 1 H, *J* = 11.5, 1.5 Hz), 5.78 (m, 1 H), 4.50 (t, *J* = 8.5 Hz), 4.33 (m, 1 H), 4.00 (dd, 1 H, *J* = 13.0, 6.0 Hz), 3.96 (dd, 1 H, *J* = 8.5, 6.5 Hz), 3.42 (m, 1 H), 3.06 (dd, 1 H, *J* = 13.0, 10.0 Hz), 2.64 (t, 4 H, *J* = 5.0 Hz), 1.64 (m, 4 H), 1.49 (m, 2 H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 157.9 (CO), 131.9 (CH), 126.8 (CH), 67.8 (CH₂), 57.2 (CH), 52.4 (CH), 49.8 (CH₂), 38.1 (CH₂), 26.4 (CH₂), 24.4 (CH₂).

ESMS *m/z* 222 (M, 13%), 223 (M + 1, 100%), 240 (M + 18, 29%). Anal. Calcd. For C₁₂H₁₈N₂O₂: C, 64.84; H, 8.16; N, 12.60; found C, 65.14; H, 8.06; N, 12.79.

(6*R*,8*aS*)-6-Morpholino-1,5,6,8*a*-tetrahydro-3*H*-oxazolo[3,4-*a*]pyridin-3-one (151). General procedure was carried out with **145** (30 mg, 0.15 mmol), [Pd(μ^3 -C₃H₅)Cl]₂ (11 mg, 7.5 %), dppe (9 mg, 15 %) and morpholine (40 μ l, 0.46 mmol) and THF (3 mL). After 3 h, workup and purification by column chromatography using Et₃N (2.5 % v/v) with with hexane-EtOAc increasing polarity ratio from 0 to 100% EtOAc to give **151** as a

white solid. Yield: 30 mg (91%). R_f 0.19 (1:2 hexane-EtOAc). $[\alpha]_D - 32.8$ (c 1.0, CHCl_3). Mp 51-53 °C. ν_{max} (thin film) 2925, 1744, 1653, 1476, 1449, 1418, 1231, 1113 cm^{-1} .

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 5.92 (dd, 1 H, $J = 11.5, 1.5$ Hz), 5.78 (dd, 1 H, $J = 11.5, 1.5$ Hz), 4.44 (t, 1 H, $J = 8.5$ Hz), 4.36 (m, 1 H), 4.05 (dd, 1 H, $J = 13.0, 6.5$ Hz), 3.91 (dd, 1 H, $J = 8.5, 6.0$ Hz), 3.67 (t, 2 H, $J = 4.5$ Hz), 3.43 (m, 1 H), 2.99 (dd, 4 H, $J = 13.0, 10.0$ Hz), 2.61 (t, 4 H, $J = 4.7$ Hz).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 157.6 (CO), 130.5 (CH), 127.7 (CH), 67.6 (CH_2), 67.2 (CH_2), 56.6 (CH), 52.4 (CH), 49.8 (CH_2), 38.4 (CH_2).

ESMS m/z 225 ($M + 1$, 100%), 242 ($M + 18$, 47%). Anal. Calcd. For $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3$: C, 58.91; H, 7.19; N, 12.49; found C, 58.82; H, 7.33; N, 12.61.

(6*R*,8*aS*)-6-(Azepan-1-yl)-1,5,6,8*a*-tetrahydro-3*H*-oxazolo[3,4-*a*]pyridin-3-one (152). General procedure was carried out with **145** (30 mg, 0.15 mmol), $[\text{Pd}(\mu^3\text{-C}_3\text{H}_5)\text{Cl}]_2$ (11 mg, 7.5%), dppe (9 mg, 15%) and hexamethyleneimine (50 μl , 0.4 mmol) and THF (5 mL). After 3 h, workup and purification by column chromatography using Et_3N (2.5 % v/v) with with hexane-EtOAc increasing polarity ratio from 0 to 100% EtOAc to give **152** as a white solid. Yield: 31 mg (88%). R_f 0.16 (1:2 hexane-EtOAc). $[\alpha]_D - 45.7$ (c 0.8, CHCl_3). Mp 69-71 °C. ν_{max} (thin film) 2925, 2851, 1752, 1653, 1559, 1456, 1420, 1232, 1065 cm^{-1} .

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 5.93 (dd, 1 H, $J = 11.0, 1.0$ Hz), 5.73 (m, 1 H), 4.47 (t, 1 H, $J = 8.5$ Hz), 4.33 (m, 1 H), 4.05 (dd, 1 H, $J = 13.0, 6.0$ Hz), 3.91 (dd, 1 H, $J = 8.5, 6.5$ Hz), 3.52 (m, 1 H), 2.87 (dd, 1 H, $J = 13.0, 10.0$ Hz), 2.70 (m, 4 H), 1.59 (s, 4 H), 1.26 (s, 4 H).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 157.8 (CO), 132.7 (CH), 126.7 (CH), 67.8 (CH_2), 58.2 (CH), 52.5 (CH), 51.5 (CH_2), 39.2 (CH_2), 29.8 (CH_2), 26.8 (CH_2).

ESMS m/z 237 ($M + 1$, 100%), 254 ($M + 18$, 29%). Anal. Calcd. For $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2$: C, 66.07; H, 8.53; N, 11.85; found C, 65.87; H, 8.39; N, 11.93.

(6*R*,8*aS*)-6-(Isoindolin-2-yl)-5,6-dihydro-1*H*-oxazolo[3,4-*a*]pyridin-3(8*aH*)-one (153). General procedure was carried out with **145** (302 mg, 1.5 mmol), [Pd(μ^3 -C₃H₅)Cl]₂ (42 mg, 0.1 mmol), dppe (92 mg, 0.2 mmol) and isoindoline (356 μ L, 3.0 mmol) and THF (12 mL). After 3 h, workup and purification by column chromatography using Et₃N (2.5 % v/v) with hexane-EtOAc increasing polarity ratio from 0 to 100% EtOAc to give **153** as a white solid. Yield: 310 mg (79%). *R*_f 0.12 (1:2 hexane-EtOAc). [α]_D - 45.7 (*c* 0.8, CHCl₃). Mp 69-71 °C. ν_{max} (thin film) 1734, 1417, 1235, 1061, 998 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.22 (s, 4 H), 6.09 (dq, 1 H, *J* = 10.5, 2.0 Hz), 5.84 (dt, 1 H, *J* = 10.5, 2.0 Hz), 4.50 (dd, 1 H, *J* = 9.0, 8.0 Hz), 4.40 (m, 1 H), 4.18 (dd, 1 H, *J* = 13.0, 6.0 Hz), 4.15-4.06 (m, 4 H), 3.97 (dd, 1 H, *J* = 8.0, 6.0 Hz), 3.62 (m, 1 H), 3.02 (dd, 1 H, *J* = 13.0, 10.0 Hz).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 157.6 (CO), 139.1 (CH), 130.0 (CH), 127.2 (CH), 126.9 (CH), 122.4 (CH), 67.7 (CH₂), 55.5 (CH₂), 54.8 (CH), 52.5 (CH), 41.7 (CH₂).

HRMS (ES). Calcd. For C₁₅H₁₆N₂O₂: 257.12845; found 257.12837.

2-((6*R*,8*aS*)-3-oxo-3,5,6,8*a*-tetrahydro-1*H*-oxazolo[3,4-*a*]pyridin-6-yl)isoindoline-1,3-dione (154). A solution of **146** (3.25 g, 14.3 mmol), [Pd(μ^3 -C₃H₅)Cl]₂ (267 mg, 0.7 mmol) and dppe (576 mg, 1.4 mmol) in dimethoxyethane (50 mL) was added via cannula over a flame dried Scklenk previously charged with phthalimide (3.40 g, 22.9 mmol), Cs₂CO₃ (6.99 g, 21.5 mmol) and dimethoxyethane (36 mL). The mixture was heated at 85 °C for 45 minutes. The crude was treated by adding 1 M HCl (15 mL), extracted with EtOAc (3 x 20 mL), dried over MgSO₄ and purified by column chromatography using hexane-EtOAc increasing polarity ratio from 0 to 100% EtOAc to give **154** as a white solid. Yield: 3.07 g (75%). *R*_f 0.34 (1:2 hexane-EtOAc). [α]_D - 75.5 (*c* 0.5, CHCl₃). Mp 163-166 °C. ν_{max} (thin film) 1753, 1713, 1385, 1063, 719 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.86 (dd, 2 H, *J* = 5.5, 3.0 Hz), 7.76 (dd, 2 H, *J* = 5.5, 3.0 Hz), 5.92 (ddd, 1 H, *J* = 10.5, 2.5, 1.0 Hz), 5.83 (dd, 1 H, *J* = 10.5, 1.0 Hz), 5.07

(ddd, 1 H, $J = 7.0, 6.0, 2.5$ Hz), 4.57 (m, 2 H), 4.07 (ddd, 1 H, $J = 13.0, 7.0, 1.0$ Hz), 4.03 (dd, 1 H, $J = 13.0, 10.5$ Hz), 3.63 (dd, 1 H, $J = 13.0, 10.5$ Hz).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 167.5 (CO), 157.2 (CO), 134.3 (CH), 131.6 (C), 128.6 (CH), 127.2 (CH), 123.5 (CH), 67.7 (CH_2), 51.8 (CH), 43.1 (CH), 39.9 (CH_2).

HRMS (ES). Calcd. For $\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_4$: 285.0875; found 285.0872. Anal. Calcd. For $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4$: 63.38; H, 4.26; N, 9.85; found C, 63.24; H, 4.43; N, 9.80.

***N*-((6*R*,8*aS*)-3-oxo-3,5,6,8*a*-tetrahydro-1*H*-oxazolo[3,4-*a*]pyridin-6-yl)acetamide (155).** To a solution of **154** (903 mg, 3.2 mmol) in EtOH (25 mL) was added hydrazine monohydrate (470 μL , 9.5 mmol). The mixture was heated at reflux for 1 h. Solvent was removed under reduced pressure and the crude redissolved in 2:1 mixture of CH_2Cl_2 -py (20 mL). Ac_2O (1.44 mL, 10.2 mmol) was added dropwise and the mixture was stirred for 16 h. Then solvent was removed in vacuo and the crude purified by column chromatography using CH_2Cl_2 -MeOH increasing polarity ratio from 0 to 15% CH_2Cl_2 to give **155** as a white solid. Yield: 614 mg (98%). R_f 0.57 (9:1 CH_2Cl_2 -MeOH). $[\alpha]_D - 54.4$ (c 0.58, CHCl_3). Mp 147-150 $^\circ\text{C}$. ν_{max} (thin film) 2923, 1742, 1660, 1494, 1380, 1079 cm^{-1} .

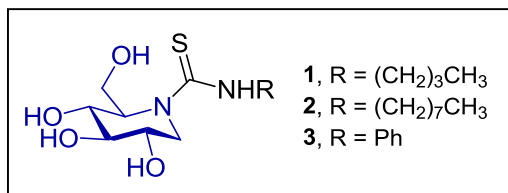
^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 5.89 (ddd, 1 H, $J = 10.5, 2.5, 2.0$ Hz), 5.77 (ddd, 1 H, $J = 10.5, 2.5, 2.0$ Hz), 4.53 (m, 2 H, $J = 8.0$ Hz), 4.46 (m, 1 H), 4.06 (ddd, 1 H, $J = 13.0, 6.5, 1.0$ Hz), 4.00 (dd, 1 H, $J = 8.0, 6.5$ Hz), 2.85 (dd, 1 H, $J = 13.0, 10.0$ Hz), 1.96 (s, 3 H).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 173.0 (CO), 159.8 (CO), 130.7 (CH), 128.9 (CH), 69.4 (CH_2), 53.7 (CH), 43.9 (CH), 43.5 (CH_2), 22.5 (CH_3).

HRMS (ES). Calcd. For $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_3$: 197.09207; found 197.09217. Anal. Calcd. For $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_3$: 55.09; H, 6.16; N, 14.28; found C, 54.82; H, 6.13; N, 14.26.

10.3. New Compounds.

Preparation of monocyclic derivatives of DNJ.



To a solution of DNJ hydrochloride (102 mg, 0.63 mmol) in pyridine (9.1 mL), Et₃N (0.1 mL, 0.75 mmol) and the corresponding isothiocyanate (0.69 mmol) were added. The mixture was stirred at rt for 18 h and the solvent was removed. The resulting residue was coevaporated several times with toluene and purified by column chromatography using the eluent indicated in each case to afford the thioureido derivatives.

***N*-(*N*'-Butylthiocarbamoyl)-1-deoxynojirimicin (1).** Column chromatography (90:10:1 CH₂Cl₂-MeOH-H₂O). Yield: 109 mg (62%). *R_f* 0.29 (70:10:1 CH₂Cl₂-MeOH-H₂O). [α]_D - 206.0 (*c* 1.0, MeOH). UV (MeOH) λ_{max} 247 nm (ε_{mM} 13.0).

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 4.54 (d, 1 H, *J*_{1a,1b} = 14.7 Hz, H-1a), 4.35 (m, 1 H, H-5), 3.89 (dd, 1 H, *J*_{6a,6b} = 11.3 Hz, *J*_{5,6a} = 3.9 Hz, H-6a), 3.84 (dd, 1 H, *J*_{5,6b} = 7.8 Hz, H-6b), 3.73 (m, 1 H, H-2), 3.57 (m, 3 H, H-4, CH₂N), 3.52 (t, 1 H, *J*_{2,3} = *J*_{3,4} = 6.4 Hz, H-3), 3.50 (dd, 1 H, *J*_{1b,2} = 3.6 Hz, H-1b), 1.59 (m, 2 H, CH₂), 1.39 (m, 2 H, CH₂), 0.95 (t, 3 H, ³*J*_{H,H} = 7.4 Hz, CH₃).

¹³C NMR (125.7 MHz, CD₃OD) δ 186.4 (CS), 75.2 (C-3), 73.8 (C-2), 70.9 (C-4), 66.6 (C-5), 62.3 (C-6), 48.3 (C-1), 46.7 (CH₂N), 32.3 (CH₂), 21.1 (CH₂CH₃), 14.2 (CH₃).

FABMS *m/z* 301 (100, [M + Na]⁺), 279 (10, [M + H]⁺). Anal. Calcd for C₁₁H₂₂N₂O₄S: C, 47.46; H, 7.97; N, 10.06; S, 11.52. Found: C, 47.43; H, 7.77; N, 9.84; S, 11.17.

***N*-(*N*'-Octylthiocarbamoyl)-1-deoxynojirimicin (2).** Column chromatography (100:10:1 → 70:10:1 CH₂Cl₂-MeOH-H₂O). Yield: 156 mg (75%). *R_f* 0.60 (40:10:1 CH₂Cl₂-MeOH-H₂O). [α]_D - 171.6 (*c* 1.0, MeOH). UV (MeOH) λ_{max} 248 nm (ε_{mM} 12.8).

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 4.55 (d, 1 H, *J*_{1a,1b} = 14.6 Hz, H-1a), 4.37 (m, 1 H, H-5), 3.89 (dd, 1 H, *J*_{6a,6b} = 11.3 Hz, *J*_{5,6a} = 4.0 Hz, H-6a), 3.85 (dd, 1 H, *J*_{5,6b} = 7.7 Hz, H-6b), 3.73 (m, 1 H, H-2), 3.57 (m, 4 H, H-4, H-3, CH₂N), 3.50 (dd, 1 H, *J*_{1b,2} = 3.5 Hz, H-1b), 1.61 (m, 2 H, CH₂), 1.32 (m, 10 H, CH₂), 0.90 (t, 3 H, ³*J*_{H,H} = 7.1 Hz, CH₃).

¹³C NMR (125.7 MHz, CD₃OD) δ 186.5 (CS), 75.1 (C-3), 73.7 (C-2), 71.1 (C-4), 66.6 (C-5), 62.4 (C-6), 48.3 (C-1), 47.1 (CH₂N), 32.9, 30.4, 30.3, 30.1, 28.0 (CH₂), 23.6 (CH₂CH₃), 14.3 (CH₃).

FABMS *m/z* 357 (100, [M + Na]⁺), 335 (10, [M + H]⁺). Anal. Calcd for C₁₅H₃₀N₂O₄S: C, 53.86; H, 9.04; N, 8.38; S, 9.59. Found: C, 53.72; H, 8.97; N, 8.32; S, 9.40.

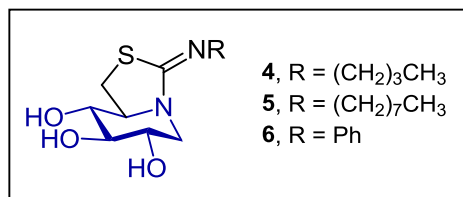
***N*-(*N*'-Phenylthiocarbamoyl)-1-deoxynojirimicin (3).** Column chromatography (100:10:1 → 90:10:1 CH₂Cl₂-MeOH-H₂O). Yield: 92 mg (49%). *R_f* 0.29 (70:10:1 CH₂Cl₂-MeOH-H₂O). [α]_D - 196.7 (*c* 1.0, MeOH). UV (MeOH) λ_{max} 255 nm (ε_{mM} 12.1).

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 7.35-7.09 (m, 5 H, Ph), 4.72 (d, 1 H, *J*_{1a,1b} = 14.6 Hz, H-1a), 4.61 (m, 1 H, H-5), 3.98 (d, 2 H, *J*_{5,6} = 5.8 Hz, H-6), 3.81 (m, 1 H, H-2), 3.69 (m, 1 H, H-4), 3.63 (m, 2 H, H-3, CH₂N), 3.62 (dd, 1 H, *J*_{1b,2} = 3.8 Hz, H-1b).

¹³C NMR (75.5 MHz, CD₃OD) δ 186.4 (CS), 141.9-125.5 (Ph), 74.8 (C-3), 73.6 (C-2), 71.0 (C-4), 66.9 (C-5), 62.4 (C-6), 50.9 (C-1).

FABMS *m/z* 321 (90, [M + Na]⁺), 299 (20, [M + H]⁺). Anal. Calcd for C₁₃H₁₈N₂O₄S: C, 52.33; H, 6.08; N, 9.39; S, 10.75. Found: C, 52.14; H, 5.86; N, 9.11; S, 10.49.

Preparation of bicyclic derivatives of DNJ.



To a solution of the corresponding thioureido derivative (0.27 mmol) in MeOH (8.5 mL), concentrated HCl was added until pH 1 (1-2 drops). The reaction mixture was stirred at rt for 12 h and the solvent was removed. The resulting residue was coevaporated several times with MeOH until neutral pH and purified by column chromatography using the eluent indicated in each case.

5-*N*,6-*S*-(*N*'-Butyliminomethylidene)-6-thio-1-deoxynojirimycin (4). Column chromatography (70:10:1 → 40:10:1 CH₂Cl₂-MeOH-H₂O). Yield: 71 mg (quantitative). *R_f* 0.31 (40:10:1 CH₂Cl₂-MeOH-H₂O). [α]_D + 13.7 (*c* 1.2, MeOH).

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 4.14 (dd, 1 H, *J*_{1a,1b} = 13.1 Hz, *J*_{1a,2} = 5.6 Hz, H-1a), 3.97 (m, 1 H, H-5), 3.72 (dd, 1 H, *J*_{6a,6b} = 11.4 Hz, *J*_{5,6a} = 7.7 Hz, H-6a), 3.52 (m, 1 H, H-2), 3.47 (dd, 1 H, *J*_{5,6a} = 7.4 Hz, H-6b), 3.37 (m, 4 H, H-3, H-4, CH₂N), 3.00 (dd, 1 H, *J*_{1b,2} = 11.0 Hz, H-1b), 1.66 (m, 2 H, CH₂), 1.40 (m, 2 H, CH₂), 0.97 (t, 3 H, ³*J*_{H,H} = 7.4 Hz, CH₃).

¹³C NMR (125.7 MHz, CD₃OD) δ 171.5 (CN), 78.8 (C-3), 73.8 (C-4), 69.5 (C-2), 69.1 (C-5), 50.5 (CH₂N), 48.8 (C-1), 32.3 (CH₂), 31.9 (C-6), 20.8 (CH₂), 13.9 (CH₃).

FABMS *m/z* 261 (100, [M + H]⁺). Anal. Calcd for C₁₁H₂₀N₂O₃S: C, 50.75; H, 7.74; N, 10.76; S, 12.32. Found: C, 50.41; H, 7.55; N, 10.37; S, 12.01.

5-*N*,6-*S*-(*N*'-Octyliminomethylidene)-6-thio-1-deoxynojirimycin (5). Column chromatography (70:10:1 → 40:10:1 CH₂Cl₂-MeOH-H₂O). Yield: 85 mg (quantitative). *R_f* 0.34 (40:10:1 CH₂Cl₂-MeOH-H₂O). [α]_D + 11.7 (*c* 0.96, MeOH).

^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 4.13 (dd, 1 H, $J_{1a,1b} = 13.1$ Hz, $J_{1a,2} = 5.6$ Hz, H-1a), 3.96 (m, 1 H, H-5), 3.72 (dd, 1 H, $J_{6a,6b} = 11.4$ Hz, $J_{5,6a} = 7.7$ Hz, H-6a), 3.52 (m, 1 H, H-2), 3.46 (dd, 1 H, $J_{5,6a} = 7.5$ Hz, H-6b), 3.37 (m, 4 H, H-3, H-4, CH_2N), 3.00 (dd, 1 H, $J_{1b,2} = 11.1$ Hz, H-1b), 1.68 (m, 2 H, CH_2), 1.33 (m, 10 H, CH_2), 0.91 (t, 3 H, $^3J_{\text{H,H}} = 7.1$ Hz, CH_3).

^{13}C NMR (125.7 MHz, CD_3OD) δ 171.3 (CN), 78.8 (C-3), 73.8 (C-4), 69.5 (C-2), 69.0 (C-5), 50.8 (CH_2N), 48.7 (C-1), 32.9 (CH_2), 31.9 (C-6), 30.3, 30.2, 27.7, 23.7 (CH_2), 14.4 (CH_3).

FABMS m/z 317 (100, $[\text{M} + \text{H}]^+$). HRFABMS m/z 317.1910; calcd. for $\text{C}_{15}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$: 317.1899.

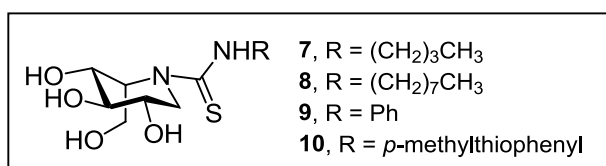
5-*N*,6-*S*-(*N'*-Phenyliminomethylidene)-6-thio-1-deoxynojirimycin (6). Column chromatography (100:10:1 \rightarrow 20:10:1 CH_2Cl_2 -MeOH- NH_4OH). Yield: 30 mg (40%). $[\alpha]_{\text{D}} + 3.0$ (c 0.5, MeOH). R_f 0.50 (50:10:1 CH_2Cl_2 -MeOH- H_2O).

^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ 7.28-6.88 (m, 5 H, Ph), 4.29 (dd, 1 H, $J_{1a,1b} = 12.8$ Hz, $J_{1a,2} = 5.5$ Hz, H-1a), 3.53 (m, 2 H, H-5, H-2), 3.39 (dd, 1 H, $J_{6a,6b} = 10.9$ Hz, $J_{5,6a} = 6.7$ Hz, H-6a), 3.33 (m, 2 H, H-3, H-4), 3.14 (dd, 1 H, $J_{5,6a} = 6.3$ Hz, H-6b), 2.74 (dd, 1 H, $J_{1b,2} = 10.8$ Hz, H-1b).

^{13}C NMR (75.5 MHz, CD_3OD) δ 162.7 (CN), 152.7-123.3 (Ph), 79.8 (C-3), 74.2 (C-4), 70.0 (C-2), 66.0 (C-5), 48.9 (C-1), 30.7 (C-6).

FABMS m/z 281 (30, $[\text{M} + \text{H}]^+$). Anal. Calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$: C, 55.70; H, 5.75; N, 9.99; S, 11.44. Found: C, 55.39; H, 5.53; N, 9.78; S, 11.17.

Preparation of monocyclic derivatives of L-IDJ.



To a solution of L-DIJ hydrochloride (100 mg, 0.613 mmol) in pyridine (5 mL), Et₃N (100 μ L, 0.735 mmol) and the corresponding isothiocyanate (0.674 mmol) were added. The mixture was stirred at rt for 18 h and concentrated. The resulting residue coevaporated several times with toluene and purified by column chromatography using the eluent indicated in each case.

***N*-(*N*'-Butylthiocarbamoyl)-1-deoxy-L-idonojirimycin (7).** Column chromatography (2:1 EtOAc-cyclohexane \rightarrow EtOAc \rightarrow 20:1 EtOAc-EtOH \rightarrow 45:5:3 EtOAc-EtOH-H₂O). Yield: 141 mg (83%). *R_f* 0.39 (45:5:3 EtOAc-EtOH-H₂O). [α]_D + 118.8 (*c* 0.69, EtOH). UV (EtOH) λ_{max} 250 nm (ϵ_{mM} 10.8).

¹H NMR (500 MHz, 9:1 acetone-*d*₆/D₂O, 313 K) δ 4.96 (dd, 1 H, *J*_{1a,1b} = 13.3 Hz, *J*_{1a,2} = 4.3 Hz, H-1a), 4.82 (m, 1 H, H-5), 4.00 (dd, 1 H, *J*_{6a,6b} = 11.5 Hz, *J*_{5,6a} = 3.8 Hz, H-6a), 3.87 (dd, 1 H, *J*_{5,6b} = 9.3 Hz, H-6b), 3.57 (m, 2 H, CH₂NH₂), 3.52 (dd, 1 H, *J*_{3,4} = 9.4 Hz, *J*_{4,5} = 5.9 Hz, H-4), 3.46 (m, 1 H, H-3), 3.40 (m, 1 H, H-2), 2.92 (dd, 1 H, *J*_{1b,2} = 10.8 Hz, H-1b), 1.56 (m, 2 H, CH₂CH₂NH₂), 1.33 (m, 2 H, CH₂CH₃), 0.89 (t, 3 H, CH₃).

¹³C NMR (500 MHz, 9:1 acetone-*d*₆/D₂O, 313 K) δ 185.7 (CS), 76.4 (C-3), 71.8 (C-4), 70.4 (C-2), 61.6 (C-5), 58.1 (C-6), 48.3 (C-1), 46.3 (CH₂NH₂), 31.8, 20.7 (CH₂), 14.1 (CH₃).

ESIMS *m/z* 301 ([M + Na]⁺). Anal. Calcd. for C₁₁H₂₂N₂O₄S: C, 47.46; H, 7.97; N, 10.06; S, 11.52. Found: C, 47.21; H, 7.901; N, 9.74; S, 11.18.

***N*-(*N*'-Octylthiocarbamoyl)-1-deoxy-L-idonojirimycin (8).** Column chromatography (3:1 EtOAc-petroleum ether \rightarrow EtOAc \rightarrow 20:1 EtOAc-EtOH \rightarrow 45:5:3 EtOAc-EtOH-H₂O). Yield: 170 mg (83%). *R_f* 0.48 (45:5:3 EtOAc-EtOH-H₂O). [α]_D – 102.1 (*c* 0.87, EtOH). UV (EtOH) λ_{max} 251 nm (ϵ_{mM} 8.6).

¹H NMR (300 MHz, 9:1 acetone-*d*₆/D₂O, 313 K) δ 4.94 (dd, 1 H, *J*_{1a,1b} = 13.6 Hz, *J*_{1a,2} = 4.5 Hz, H-1a), 4.85 (m, 1 H, H-5), 4.00 (dd, 1 H, *J*_{6a,6b} = 11.5 Hz, *J*_{5,6a} = 3.9 Hz, H-

6a), 3.87 (dd, 1 H, $J_{5,6b} = 9.3$ Hz, H-6b), 3.54 (m, 2 H, CH_2NH_2), 3.52 (m, 3 H, H-2, H-3, H-4), 2.93 (dd, 1 H, $J_{1b,2} = 10.6$ Hz, H-1b), 1.57 (m, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 1.27 (m, 10 H, CH_2), 0.86 (t, 3 H, CH_3).

^{13}C NMR (75.5 MHz, 9:1 acetone- d_6 /D $_2$ O, 313 K) δ 185.6 (CS), 76.3 (C-3), 71.7 (C-4), 70.4 (C-2), 61.6 (C-5), 58.1 (C-6), 48.3 (C-1), 46.6 (CH_2NH_2), 32.4, 27.6, 23.2 (CH_2), 14.2 (CH_3).

ESIMS m/z 357 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$). Anal. Calcd. for $\text{C}_{15}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$: C, 53.86; H, 9.04; N, 8.38; S, 9.59. Found: 53.64; H, 8.873; N, 8.10; S, 9.21.

***N*-(*N'*-Phenylthiocarbamoyl)-1-deoxy-L-idonojirimycin (9).** Column chromatography (3:1 EtOAc-petroleum ether \rightarrow EtOAc \rightarrow 20:1 EtOAc-EtOH \rightarrow 45:5:3 EtOAc-EtOH-H $_2$ O). Yield: 146 mg (80%). R_f 0.47 (45:5:3 EtOAc-EtOH-H $_2$ O). $[\alpha]_D^{20} + 56.1$ (c 1.0, MeOH). UV (MeOH) λ_{max} 256 nm (ϵ_{mM} 11.3).

^1H NMR (500 MHz, CD $_3$ OD, 313 K) δ 7.32-7.10 (m, 5 H, Ph), 5.03 (m, 1 H, H-5), 4.97 (d, 1 H, $J_{1a,1b} = 13.5$ Hz, H-1a), 4.09 (dd, 1 H, $J_{6a,6b} = 11.5$ Hz, $J_{5,6a} = 3.6$ Hz, H-6a), 3.96 (dd, 1 H, $J_{5,6b} = 9.8$ Hz, H-6b), 3.64 (dd, 1 H, $J_{3,4} = 9.6$ Hz, $J_{4,5} = 6.3$ Hz, H-4), 3.49 (m, 2 H, H-2, H-3), 3.04 (dd, 1 H, $J_{1b,2} = 10.6$ Hz, H-1b).

^{13}C NMR (125.7 MHz, CD $_3$ OD, 313 K) δ 191.0 (CS), 129.5-125.6 (Ph), 76.5 (C-3), 71.9 (C-4), 70.9 (C-2), 63.5 (C-5), 58.5 (C-6), 48.3 (C-1).

ESIMS m/z 297 ($[\text{M} - \text{H}]^-$). Anal. Calcd. for $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$: C, 52.33; H, 6.08; N, 9.39; S, 10.75. Found: C, 52.05; H, 5.922; N, 9.17; S, 10.39.

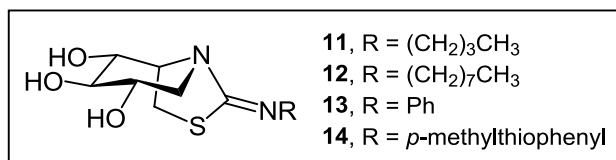
***N*-(*N'*-*p*-Methylthiophenylthiocarbamoyl)-1-deoxy-L-idonojirimycin (10).** Column chromatography (40:1 EtOAc-EtOH \rightarrow 20:1 EtOAc-EtOH \rightarrow 45:5:3 EtOAc-EtOH-H $_2$ O). Yield: 133 mg (69%). R_f 0.53 (45:5:3 EtOAc-EtOH-H $_2$ O). $[\alpha]_D + 151.8$ (c 1.0, EtOH). UV (EtOH) λ_{max} 265 nm (ϵ_{mM} 19.8).

^1H NMR (500 MHz, 9:1 acetone- d_6 /D $_2$ O, 313 K) δ 7.34-7.19 (m, 4 H, Ph), 5.06 (d, 1 H, $J_{1a,1b}$ = 13.6 Hz, H-1a), 4.98 (m, 1 H, H-5), 4.12 (dd, 1 H, $J_{6a,6b}$ = 11.3 Hz, $J_{5,6a}$ = 3.5 Hz, H-6a), 3.98 (dd, 1 H, $J_{5,6b}$ = 9.9 Hz, H-6b), 3.64 (dd, 1 H, $J_{3,4}$ = 9.6 Hz, $J_{4,5}$ = 6.4 Hz, H-4), 3.51 (m, 1 H, H-3), 3.48 (m, 1 H, H-2), 3.01 (dd, 1 H, $J_{1b,2}$ = 10.9 Hz, H-1b), 1.45 (s, 3 H, CH $_3$).

^{13}C NMR (125.7 MHz, 9:1 acetone- d_6 /D $_2$ O, 313 K) δ 185.7 (CS), 139.5-125.3 (Ph), 76.4 (C-3), 71.6 (C-4), 70.4 (C-2), 62.8 (C-5), 58.2 (C-6), 48.8 (C-1), 16.3 (CH $_3$).

ESIMS m/z 344 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$). Anal. Calcd. for C $_{14}$ H $_{20}$ N $_2$ O $_4$ S $_2$: C, 48.82; H, 5.85; N, 8.13; S, 18.62. Found: C, 48.59; H, 5.679; N, 7.83; S, 18.25.

Preparation of bicyclic derivatives of L-IDJ.



To a solution of the corresponding thioureido derivative (0.30 mmol) in MeOH (12 mL), concentrated HCl was added until pH 1 (1-2 drops). The reaction mixture was stirred at 65-85 °C for 2-8 h and the solvent was removed. The resulting residue was coevaporated several times with MeOH until neutral pH and purified by column chromatography using the eluent indicated in each case.

5-*N*,6-*S*-(*N*'-Butyliminomethylidene)-6-thio-1-deoxy-L-idonojirimycin (**11**).

Temperature: 85 °C. Time of reaction: 8 h. Column chromatography (3:1 EtOAc-petroleum ether → EtOAc → 20:1 EtOAc-EtOH → 45:5:3 EtOAc-EtOH-H $_2$ O). Yield: 58 mg (74%). R_f 0.15 (45:5:3 EtOAc-EtOH-H $_2$ O). $[\alpha]_D + 24.0$ (*c* 1.0, EtOH).

^1H NMR (500 MHz, 9:1 acetone- d_6 /D $_2$ O) δ 4.62 (ddd, 1 H, $J_{5,6a}$ = 9.2 Hz, $J_{5,6b}$ = 7.6 Hz, $J_{4,5}$ = 1.9 Hz, H-5), 4.51 (dd, 1 H, $J_{1a,1b}$ = 14.0 Hz, $J_{1a,2}$ = 1.8 Hz, H-1a), 4.05 (m,

1 H, H-3), 4.03 (m, 1 H, H-2), 3.79 (m, 1 H, H-4), 3.74 (dd, 1 H, $J_{6a,6b} = 10.9$ Hz, H-6a), 3.68 (dd, 1 H, H-6b), 3.60 (dd, 1 H, $J_{1b,2} = 1.7$ Hz, H-1b), 3.36 (td, 2 H, CH_2NH), 1.67 (m, 2 H, CH_2CH_2NH), 1.38 (m, 2 H, CH_2CH_3), 0.90 (t, 3 H, CH_3).

^{13}C NMR (125.7 MHz, 9:1 acetone- d_6 /D $_2$ O) δ 171.8 (CN), 72.3 (C-4), 69.3 (C-2), 68.0 (C-3), 65.5 (C-5), 49.1 (CH_2NH), 48.5 (C-1), 31.8 (CH_2), 29.0 (C-6), 20.3 (CH_2), 13.9 (CH_3).

ESIMS m/z 283 ($[M + Na]^+$). Anal. Calcd. for $C_{11}H_{20}N_2O_3S$: C, 50.75; H, 7.74; N, 10.76; S, 12.32. Found: C, 50.42; H, 7.455; N, 10.39; S, 12.92.

5-*N*,6-*S*-(*N*'-Octyliminomethylidene)-6-thio-1-deoxy-L-idonojirimycin (12).

Temperature: 85 °C. Time of reaction: 8 h. Column chromatography (3:1 EtOAc-petroleum ether \rightarrow EtOAc \rightarrow 20:1 EtOAc-EtOH \rightarrow 45:5:3 EtOAc-EtOH-H $_2$ O). Yield: 85 mg (89%). R_f 0.12 (45:5:3 EtOAc-EtOH-H $_2$ O). $[\alpha]_D + 19.9$ (c 1.0, MeOH).

1H NMR (400 MHz, CD $_3$ OD) δ 4.60 (td, 1 H, $J_{5,6a} = J_{5,6b} = 8.2$ Hz, $J_{4,5} = 1.9$ Hz, H-5), 4.07 (dd, 1 H, $J_{1a,1b} = 13.8$ Hz, $J_{1a,2} = 1.8$ Hz, H-1a), 4.01 (m, 1 H, H-3), 3.90 (m, 1 H, H-2), 3.79 (m, 1 H, H-4), 3.64 (dd, 1 H, $J_{1b,2} = 2.0$ Hz, H-1b), 3.62 (m, 2 H, H-6a, H-6b), 3.36 (td, 2 H, CH_2NH).

^{13}C NMR (100.6 MHz, CD $_3$ OD) δ 172.9 (CN), 72.6 (C-4), 69.8 (C-2), 68.8 (C-3), 65.7 (C-5), 49.8 (CH_2NH), 48.4 (C-1), 30.2 (CH_2), 29.2 (C-6), 27.5, 23.7 (CH_2), 14.4 (CH_3).

ESIMS m/z 317 ($[M + H]^+$). Anal. Calcd. for $C_{15}H_{28}N_2O_3S$: C, 56.93; H, 8.92; N, 8.85; S, 10.30. Found: C, 56.98; H, 8.916; N, 8.68; S, 10.32.

5-*N*,6-*S*-(*N*'-Phenyliminomethylidene)-6-thio-1-deoxy-L-idonojirimycin (13).

Temperature: 65 °C. Time of reaction: 2 h. Column chromatography (3:1 EtOAc-petroleum ether \rightarrow EtOAc \rightarrow 20:1 EtOAc-EtOH \rightarrow 45:5:3 EtOAc-EtOH-H $_2$ O). Yield: 42 mg (50%). R_f 0.55 (45:5:3 EtOAc-EtOH-H $_2$ O). $[\alpha]_D + 50.9$ (c 1.0, MeOH).

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 7.28-6.92 (m, 5 H, Ph), 4.15 (dd, 1 H, $J_{1a,1b} = 13.5$ Hz, $J_{1a,2} = 1.4$ Hz, H-1a), 4.07 (m, 1 H, H-3), 3.9 (ddd, 1 H, $J_{5,6a} = 10.5$ Hz, $J_{5,6b} = 7.2$ Hz, $J_{4,5} = 1.6$ Hz, H-5), 3.89 (m, 1 H, H-2), 3.74 (m, 1 H, H-4), 3.41 (t, 1 H, $J_{5,6a} = J_{6a,6b} = 10.5$ Hz, H-6a), 3.27 (dd, 1 H, $J_{1a,1b} = 13.9$ Hz, $J_{1b,2} = 1.9$ Hz, H-1b), 3.10 (dd, 1 H, H-6b).

^{13}C NMR (75.5 MHz, CD_3OD) δ 165.8 (CN), 152.2-123.7 (Ph), 71.5 (C-4), 69.8 (C-2), 69.4 (C-3), 61.8 (C-5), 48.0 (C-1), 28.4 (C-6).

ESIMS m/z 281 ($[\text{M} + \text{H}]^+$). Anal. Calcd. for $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$: C, 55.70; H, 5.75; N, 9.99; S, 11.14. Found: C, 55.56; H, 5.604; N, 9.88; S, 11.32.

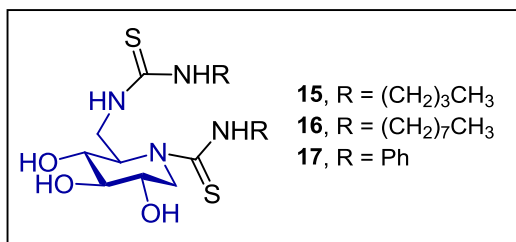
5-*N*,6-*S*-(*p*-Methylthiophenyliminomethylidene)-6-thio-1-deoxy-L-idonojirimycin (14). Temperature: 65 °C. Time of reaction: 2 h. Column chromatography (3:1 EtOAc-petroleum ether \rightarrow EtOAc \rightarrow 20:1 EtOAc-EtOH \rightarrow 45:5:3 EtOAc-EtOH- H_2O). Yield: 77 mg (79%). R_f 0.68 (45:5:3 EtOAc-EtOH- H_2O). $[\alpha]_D + 54.8$ (c 0.63, EtOH).

^1H NMR (500 MHz, 9:1 acetone- d_6 / D_2O) δ 7.19-6.83 (m, 4 H, Ph), 4.19 (dd, 1 H, $J_{1a,1b} = 13.6$ Hz, $J_{1a,2} = 1.6$ Hz, H-1a), 4.07 (m, 1 H, H-3), 3.93 (m, 1 H, H-2), 3.92 (m, 1 H, H-5), 3.74 (m, 1 H, H-4), 3.41 (m, 1 H, H-6a), 3.21 (dd, 1 H, $J_{1b,2} = 2.0$ Hz, H-1b), 3.15 (dd, 1 H, $J_{6a,6b} = 10.4$ Hz, $J_{5,6b} = 7.2$ Hz, H-6b), 2.43 (s, 3 H, CH_3).

^{13}C NMR (125.7 MHz, 9:1 acetone- d_6 / D_2O) δ 162.7 (CN), 150.4-123.6 (Ph), 71.0 (C-4), 69.3 (C-2), 68.9 (C-3), 60.9 (C-5), 47.7 (C-1), 28.1 (C-6), 16.6 (CH_3).

ESIMS m/z 349 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$). Anal. Calcd. for $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}_2$: C, 51.51; H, 5.56; N, 8.58; S, 19.65. Found: C, 51.17; H, 5.228; N, 8.30; S, 19.32.

Preparation of monocyclic derivatives of 6N-DNJ.



To a solution of 6-amino-1,6-dideoxynojirimycin dihydrochloride (6N-DNJ) (100 mg, 0.613 mmol) in pyridine (5 mL), Et₃N (100 μ L, 0.735 mmol) and the corresponding isothiocyanate (0.674 mmol) were added. The mixture was stirred at rt for 18 h and concentrated. The resulting residue coevaporated several times with toluene and purified by column chromatography using the eluent indicated in each case.

1,6-Di-*N*-(*N*'-Butylthiocarbamoyl)-6-amino-1,6-dideoxynojirimycin (15).

Column chromatography 50:1 EtOAc-EtOH. Yield: 173 mg (72%). R_f 0.58 (50:1 EtOAc-EtOH). $[\alpha]_D$ -96.2 (c 1.0, CH₃CN). UV (CH₃CN) λ_{max} 248 nm (ϵ_{mM} 19.6).

¹H NMR (500 MHz, CD₃CN, 333 K) δ 4.99 (m, 1 H, H-5), 4.59 (d, 1 H, $J_{1a,1b}$ = 14.0 Hz, H-1a), 3.94 (m, 1 H, H-6a), 3.80 (m, 1 H, H-2), 3.73 (dd, 1 H, $J_{6a,6b}$ = 14.1 Hz, $J_{5,6b}$ = 6.7 Hz, H-6b), 3.67 (m, 2 H, H-3, H-4), 3.59 (m, 2 H, NHCH₂), 3.46 (dd, 1 H, $J_{1a,1b}$ = 14.8 Hz, $J_{1a,1b}$ = 2.4 Hz, H-1b), 3.37 (m, 2 H, NHCH₂), 1.59 (m, 4 H, NHCH₂CH₂), 1.39 (m, 4 H, CH₃CH₂), 0.96 (m, 6 H, CH₃).

¹³C NMR (125.5 MHz, CD₃CN, 333 K) δ 186.9, 183.9 (CS), 72.4 (C-3 or C-4), 72.2 (C-2), 71.6 (C-3 or C-4), 62.3 (C-5), 47.0 (NHCH₂), 46.5 (C-1), 44.9 (NHCH₂, C-6), 32.2, 32.0 (NHCH₂CH₂), 20.0 (CH₃CH₂), 14.2 (CH₃).

ESIMS m/z 415 ([M + Na]⁺). Anal. Calcd. for C₁₆H₃₂N₄O₃S₂: C, 48.95; H, 8.22; N, 14.27; S, 16.34. Found: C, 48.89; H, 8.172; N, 14.03; S, 16.13.

1,6-Di-*N*-(*N*'-Octylthiocarbamoyl)-6-amino-1,6-dideoxynojirimycin (16).

Column chromatography 50:1 EtOAc-EtOH. Yield: 173 mg (72%). R_f 0.50 (50:1 EtOAc-EtOH). $[\alpha]_D - 73.4$ (c 1.0, CH₃CN). UV (CH₃CN) λ_{\max} 249 nm (ϵ_{mM} 22.5).

¹H NMR (500 MHz, CD₃CN, 333 K) δ 4.99 (m, 1 H, H-5), 4.58 (d, 1 H, $J_{1a,1b} = 14.5$ Hz, H-1a), 3.93 (m, 1 H, H-6a), 3.80 (m, 1 H, H-2), 3.73 (dd, 1 H, $J_{6a,6b} = 14.0$ Hz, $J_{5,6b} = 6.7$ Hz, H-6b), 3.68 (m, 2 H, H-3, H-4), 3.57 (m, 2 H, NHCH₂), 3.46 (dd, 1 H, $J_{1a,1b} = 14.6$ Hz, $J_{1a,1b} = 2.3$ Hz, H-1b), 3.34 (m, 2 H, NHCH₂), 1.62, 1.54 (m, 4 H, NHCH₂CH₂), 1.34 (m, 20 H, CH₂), 0.90 (t, 6 H, $^3J = 7.1$ Hz, CH₃).

¹³C NMR (125.5 MHz, CD₃CN, 333 K) δ 186.9, 183.9 (CS), 72.4 (C-3 or C-4), 72.2 (C-2), 71.6 (C-3 or C-4), 62.4 (C-5), 47.3 (NHCH₂), 46.5 (C-1), 45.2 (NHCH₂), 44.9 (C-6), 32.8-23.5 (CH₂), 14.5 (CH₃).

ESIMS m/z 527 ([M + Na]⁺). Anal. Calcd. for C₂₄H₄₈N₄O₃S₂: C, 57.10; H, 9.58; N, 11.10; S, 12.70. Found: C, 56.97; H, 9.441; N, 10.89; S, 12.39.

1,6-Di-*N*-(*N*'-Phenylthiocarbamoyl)-6-amino-1,6-dideoxynojirimycin (17).

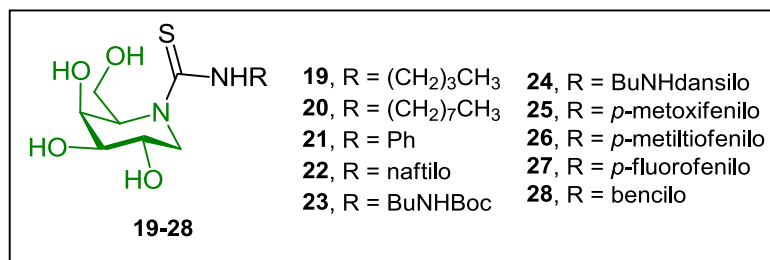
Column chromatography 50:1 EtOAc-EtOH. Yield: 232 mg (77%). R_f 0.54 (50:1 EtOAc-EtOH). $[\alpha]_D - 168.5$ (c 1.0, CH₃CN). UV (CH₃CN) λ_{\max} 257 nm (ϵ_{mM} 34.2).

¹H NMR (500 MHz, CD₃CN, 333 K) δ 7.27-7.07 (Ph), 5.34 (m, 1 H, H-5), 4.88 (m, 1 H, H-1a), 4.29 (dd, 1 H, $J_{6a,6b} = 13.3$ Hz, $J_{5,6a} = 8.7$ Hz, H-6a), 3.95 (dd, 1 H, $J_{5,6b} = 6.6$ Hz, H-6b), 3.92 (m, 1 H, H-2), 3.84 (m, 2 H, H-3, H-4), 3.68 (dd, 1 H, $J_{1a,1b} = 14.6$ Hz, $J_{1a,1b} = 2.1$ Hz, H-1b).

¹³C NMR (125.5 MHz, CD₃CN, 333 K) δ 185.8, 182.2 (CS), 130.7-124.5 (Ph), 72.3 (C-2), 71.5 (C-3 and C-4), 61.7 (C-5), 46.4 (C-1), 44.7 (C-6).

ESIMS m/z 455 ([M + Na]⁺). Anal. Calcd. for C₂₀H₂₄N₄O₃S₂: C, 55.53; H, 5.59; N, 12.95; S, 14.83. Found: C, 55.23; H, 5.784; N, 12.71; S, 14.94.

Preparation of monocyclic derivatives of DGJ.



To a solution of DGJ hydrochloride (45 mg, 0.226 mmol) in pyridine (5 mL), Et₃N (70 μ L, 0.495 mmol) and the corresponding isothiocyanate (0.248 mmol) were added. The mixture was stirred at rt for 18 h and concentrated. The resulting residue was coevaporated several times with toluene and purified by column chromatography using the eluent indicated in each case.

***N*-(*N*'-Butylthiocarbamoyl)-1-deoxygalactonojirimycin (19).** Column chromatography (CH₂Cl₂-MeOH-H₂O 70:10:1). Yield: 96 mg (79%). *R_f* 0.52 (CH₂Cl₂-MeOH-H₂O 40:10:1). [α]_D - 186.5 (*c* 0.7, MeOH). UV (MeOH) λ_{max} 249 nm (ϵ_{mM} 10.6).

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 4.82 (m, 1 H, H-5), 4.57 (d, 1 H, *J*_{1a,1b} = 14.5 Hz, H-1a), 4.06 (dd, 1 H, *J*_{4,5} = 6.4 Hz, *J*_{3,4} = 3.3 Hz, H-4), 4.04 (dd, 1H, *J*_{6a,6b} = 11.8 Hz, *J*_{5,6a} = 3.4 Hz, H-6a), 3.94 (dd, 1 H, *J*_{5,6b} = 3.4 Hz, H-6b), 3.83 (m, 1 H, H-2), 3.72 (t, 1 H, *J*_{2,3} = 3.3 Hz, H-3), 3.57 (m, 3 H, CH₂NH, H-1b), 1.59 (m, 2 H, CH₂), 1.38 (m, 2 H, CH₂CH₃), 0.95 (t, 3 H, ³*J*_{H,H} = 7.4 Hz, CH₃).

¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ 186.3 (CS), 73.1 (C-3), 72.0 (C-2), 67.8 (C-4), 63.6 (C-5), 60.1 (C-6), 46.8 (CH₂N), 46.2 (C-1), 32.2 (CH₂), 21.1 (CH₂CH₃), 14.2 (CH₃).

FABMS *m/z* 301 (100, [M + Na]⁺), 279 (40, [M + H]⁺). Anal. Calcd for C₁₁H₂₂N₂O₄S: C, 47.46; H, 7.97; N, 10.06; S, 11.52. Found: C, 47.29; H, 7.69; N, 9.78; S, 11.26.

***N*-(*N*'-Octylthiocarbamoyl)-1-deoxygalactonojirimycin (20).** Column chromatography (CH₂Cl₂-MeOH-H₂O 90:10:1). Yield: 114 mg (78%). *R*_f 0.59 (CH₂Cl₂-MeOH-H₂O 40:10:1). [α]_D – 193.7 (*c* 1.0, MeOH). UV (MeOH) λ_{max} 247 nm (ϵ_{mM} 17.3).

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 4.81 (m, 1 H, H-5), 4.57 (d, 1 H, $J_{1a,1b}$ = 14.6 Hz, H-1a), 4.06 (dd, 1 H, $J_{4,5}$ = 6.3 Hz, $J_{3,4}$ = 3.1 Hz, H-4), 4.04 (dd, 1H, $J_{6a,6b}$ = 11.8 Hz, $J_{5,6a}$ = 8.2 Hz, H-6a), 3.94 (dd, 1H, $J_{5,6b}$ = 3.3 Hz, H-6b), 3.83 (m, 1 H, H-2), 3.72 (t, 1 H, $J_{2,3}$ = 3.3 Hz, H-3), 3.56 (m, 3 H, CH₂NH, H-1b), 1.60 (m, 2 H, CH₂), 1.32 (m, 10 H, CH₂), 0.90 (t, 3 H, $^3J_{\text{H,H}}$ = 6.7 Hz, CH₃).

¹³C NMR (125.7 MHz, CD₃OD) δ 186.3 (CS), 73.1 (C-3), 72.0 (C-2), 67.8 (C-4), 63.6 (C-5), 60.1 (C-6), 47.1 (CH₂N), 46.2 (C-1), 33.0, 30.5, 30.4, 30.1, 28.0 (CH₂), 23.7 (CH₂CH₃), 14.4 (CH₃).

FABMS *m/z* 357 (85, [M + Na]⁺), 335 (25, [M + H]⁺). Anal. Calcd for C₁₅H₃₀N₂O₄S: C, 53.86; H, 9.04; N, 8.38; S, 9.59. Found: C, 54.43; H, 8.07; N, 6.50; S, 7.32.

***N*-(*N*'-Phenylthiocarbamoyl)-1-deoxygalactonojirimycin (21).** Column chromatography (CH₂Cl₂-MeOH-H₂O 100:10:1 → 90:10:1). Yield: 100 mg (76%). *R*_f 0.37 (CH₂Cl₂-MeOH-H₂O 70:10:1). [α]_D – 105.1 (*c* 1.0, MeOH).

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 7.35-7.08 (m, 5 H, Ph), 5.05 (m, 1 H, H-5), 4.73 (da, 1 H, $J_{1a,1b}$ = 14.5 Hz, H-1a), 4.15 (m, 2 H, H-4, H-6a), 4.03 (dd, 1 H, $J_{6a,6b}$ = 11.8 Hz, $J_{5,6b}$ = 3.3 Hz, H-6b), 3.89 (m, 1 H, H-2), 3.79 (t, 1 H, $J_{2,3}$ = $J_{3,4}$ = 3.3 Hz, H-3), 3.62 (dd, 1 H, $J_{1b,2}$ = 2.3 Hz, H-1b).

¹³C NMR (75.5 MHz, CD₃OD) δ 186.7 (CS), 142.1, 129.4, 125.6, 125.3 (Ph), 72.9 (C-3), 71.9 (C-2), 67.6 (C-4), 64.1 (C-5), 60.2 (C-6), 46.9 (C-1).

FABMS *m/z* 321 (30, [M + Na]⁺), 299 (10, [M + H]⁺). Anal. Calcd for C₁₃H₁₈N₂O₄S: C, 52.33; H, 6.08; N, 9.39; S, 10.75. Found: C, 52.14; H, 5.86; N, 9.11; S, 10.49.

***N*-(*N'*-Naphtylthiocarbamoyl)-1-deoxygalactonojirimycin (22).** Column chromatography (3:1 EtOAc-petroleum ether → 45:5:3 EtOAc-EtOH-H₂O). Yield: 51 mg (65%). *R_f* 0.43 (45:5:3 EtOAc-EtOH-H₂O). [α]_D – 115.5 (*c* 0.56, EtOH). UV (EtOH) λ_{max} 223 nm (ϵ_{mM} 47.1).

¹H NMR (500 MHz, 9:1 acetone-*d*₆/D₂O, 313 K) δ 8.03–7.42 (m, 7 H, naphtyl), 5.13 (m, 1 H, H-5), 4.84 (d, 1 H, *J*_{1a,1b} = 14.6 Hz, H-1a), 4.26 (dd, 1 H, *J*_{4,5} = 6.3 Hz, *J*_{3,4} = 2.8 Hz, H-4), 4.20 (dd, 1 H, *J*_{6a,6b} = 11.5 Hz, *J*_{5,6a} = 8.7 Hz, H-6a), 4.07 (dd, 1 H, *J*_{5,6b} = 3.1 Hz, H-6b), 3.97 (m, 1 H, H-2), 3.87 (m, 1 H, H-3), 3.71 (dd, 1 H, *J*_{1b,2} = 2.0 Hz, H-1b).

¹³C NMR (125.7 MHz, 9:1 acetone-*d*₆/D₂O, 313 K) δ 187.3 (CS), 137.8–122.6 (naphtyl), 72.4 (C-3), 71.2 (C-2), 67.4 (C-4), 63.5 (C-5), 59.6 (C-6), 46.5 (C-1).

FABMS *m/z* 371 (15, [M + Na]⁺), 349 (10, [M + H]⁺). Anal. Calcd. for C₁₇H₂₀N₂O₄S: C, 58.60; H, 5.79; N, 8.04; S, 9.20. Found: 58.46; H, 5.854; N, 7.87; S, 8.83.

***N*-[*N'*-4-(*tert*-Butoxycarbonylamino)butylthiocarbamoyl]-1-deoxygalactonojirimycin (23).** Column chromatography (eluent 80:10:1 → 60:10:1 CH₂Cl₂-MeOH-H₂O). Yield: 76 mg (86%). *R_f* 0.19 (40:10:1 CH₂Cl₂-MeOH-H₂O). [α]_D – 100.7 (*c* 1.0, MeOH). UV (MeOH) λ_{max} 249 nm (ϵ_{mM} 12.2).

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD, 318 K) δ 4.84 (m, 1 H, *J*_{5,6a} = 7.8 Hz, *J*_{5,6b} = 3.7 Hz, H-5), 4.55 (d, 1 H, *J*_{1a,1b} = 14.7 Hz, H-1a), 4.07 (dd, 1 H, *J*_{4,5} = 5.4 Hz, *J*_{3,4} = 3.0 Hz, H-4), 4.04 (dd, 1 H, *J*_{6a,6b} = 11.9 Hz, H-6a), 3.95 (dd, 1 H, H-6b), 3.84 (m, 1 H, H-2), 3.72 (m, 1 H, H-3), 3.59 (m, 3 H, H-1b, CH₂NHCS), 3.07 (m, 2 H, CH₂NHBoc), 1.53, 1.42 (2 m, 4 H, CH₂), 1.43 (s, 9 H, CMe₃).

¹³C NMR (75.5 MHz, CD₃OD, 313 K) δ 186.2 (CS), 158.3 (CO), 79.8 (CMe₃), 73.0 (C-3), 71.9 (C-2), 67.8 (C-4), 63.4 (C-5), 60.1 (C-6), 46.5 (CH₂NHCS), 46.2 (C-1), 41.0 (CH₂NHBoc), 28.7 (CMe₃), 28.7, 27.3 (CH₂).

FABMS m/z 416 (60, $[M + Na]^+$), 394 (40, $[M + H]^+$). Anal. Calcd. for $C_{16}H_{31}N_3O_6S$: C, 48.84; H, 7.94; N, 10.68; S, 8.15. Found: C, 48.55; H, 7.61; N, 10.33; S, 7.84.

***N*-(*N'*-4-Dansylaminobutylthiocarbamoyl)-1-deoxygalactonojirimycin (24).**

To a solution of **43** (120 mg, 0.33 mmol) in pyridine (5 mL), Et_3N (60 μ L, 0.36 mmol) and DGJ (65 mg, 0.33 mmol) were added. The mixture was stirred at rt for 18 h, concentrated and coevaporated several times with toluene. The resulting residue was purified by column chromatography (10:1 CH_3CN - H_2O - NH_4OH). Yield: 49 mg (47%). R_f 0.35 (CH_3CN - H_2O - NH_4OH 10:1:1). $[\alpha]_D - 64.1$ (c 1.0, MeOH).

1H NMR (300 MHz, CD_3OD , 313 K) δ 8.57-7.25 (m, 6 H, dansyl), 5.80 (m, 1 H, $J_{4,5} = 6.4$ Hz, $J_{5,6a} = 8.2$ Hz, $J_{5,6b} = 3.7$ Hz, H-5), 4.29 (d, 1 H, $J_{1a,1b} = 14.7$ Hz, H-1a), 4.05 (dd, 1 H, $J_{3,4} = 3.2$ Hz, H-4), 4.02 (dd, 1 H, $J_{6a,6b} = 12.2$ Hz, H-6a), 3.93 (dd, 1 H, H-6b), 3.82 (m, 1 H, H-2), 3.71 (m, 1 H, H-3), 3.53 (dd, 1 H, $J_{1a,2} = 2.3$ Hz, H-1b), 3.41 (td, 2 H, CH_2NHCS), 2.88 (m, 8 H, CH_2NHSO_2 , NMe_2), 1.45 (m, 4 H, CH_2CH_2).

^{13}C NMR (75.5 MHz, CD_3OD , 313 K) δ 186.3 (CS), 153.2-1216.4 (dansyl), 73.2 (C-3), 72.1 (C-2), 67.9 (C-4), 63.5 (C-5), 60.2 (C-6), 46.2 (CH_2NHCS), 45.8 (C-1), 43.6 (CH_2NHSO_2), 27.9, 27.1 (CH_2).

FABMS m/z 549 (30, $[M + Na]^+$), 527 (20, $[M + H]^+$). Anal. Calcd. for $C_{19}H_{34}N_4O_6S_2$: C, 52.45; H, 6.51; N, 10.64; S, 12.18. Found: C, 52.09; H, 6.183; N, 10.30; S, 11.79

***N*-(*N'*-*p*-Methoxyphenylthiocarbamoyl)-1-deoxygalactonojirimycin (25).**

Column chromatography (3:1 EtOAc-petroleum ether \rightarrow 20:1 EtOAc-EtOH \rightarrow 45:5:3 EtOAc-EtOH- H_2O). Yield: 60 mg (76%). R_f 0.45 (45:5:3 EtOAc-EtOH- H_2O). $[\alpha]_D - 182.6$ (c 1.0, EtOH). UV (EtOH) λ_{max} 259 nm (ϵ_{mM} 17.3).

1H NMR (500 MHz, 9:1 acetone- d_6 / D_2O) δ 7.30-6.83 (m, 4 H, Ph), 4.95 (m, 1 H, H-5), 4.72 (d, 1 H, $J_{1a,1b} = 14.2$ Hz, H-1a), 4.18 (dd, 1 H, $J_{4,5} = 6.4$ Hz, $J_{3,4} = 2.9$ Hz, H-4),

4.11 (dd, 1 H, $J_{6a,6b} = 11.7$ Hz, $J_{5,6a} = 8.4$ Hz, H-6a), 4.02 (dd, 1 H, $J_{5,6b} = 3.3$ Hz, H-6b), 3.92 (m, 1 H, H-2), 3.80 (m, 1 H, H-3), 3.75 (s, 3 H, OMe), 3.62 (dd, 1 H, $J_{1b,2} = 2.3$ Hz, H-1b).

^{13}C NMR (125.7 MHz, 9:1 acetone- d_6 /D $_2$ O) δ 186.1 (CS), 157.5-114.1 (Ph), 72.3 (C-3), 71.2 (C-2), 67.3 (C-4), 63.3 (C-5), 59.7 (C-6), 55.6 (OMe), 46.4 (C-1).

ESIMS m/z 329 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$), 351 ($[\text{M} + \text{H}]^+$). Anal. Calcd. for $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$: C, 51.21; H, 6.14; N, 8.53; S, 9.76. Found: C, 51.08; H, 6.009; N, 8.20; S, 9.40.

***N*-(*N'*-*p*-Methylthiophenylthiocarbamoyl)-1-deoxygalactonojirimycin (26).**

Column chromatography (3:1 EtOAc-petroleum ether \rightarrow 20:1 EtOAc-EtOH \rightarrow 45:5:3 EtOAc-EtOH-H $_2$ O). Yield: 73 mg (94%). R_f 0.65 (45:5:3 EtOAc-EtOH-H $_2$ O). $[\alpha]_D - 258.3$ (c 0.93, EtOH). UV (EtOH) λ_{max} 268 nm (ϵ_{mM} 8.6).

^1H NMR (500 MHz, 9:1 acetone- d_6 /D $_2$ O, 313 K) δ 7.39-7.20 (m, 4 H, Ph), 4.92 (m, 1 H, H-5), 4.78 (d, 1 H, $J_{1a,1b} = 14.5$ Hz, H-1a), 4.21 (dd, 1 H, $J_{4,5} = 6.4$ Hz, $J_{3,4} = 2.8$ Hz, H-4), 4.18 (dd, 1 H, $J_{6a,6b} = 11.5$ Hz, $J_{5,6a} = 8.7$ Hz, H-6a), 4.10 (dd, 1 H, $J_{5,6b} = 3.3$ Hz, H-6b), 3.95 (m, 1 H, H-2), 3.81 (m, 1 H, H-3), 3.66 (dd, 1 H, $J_{1b,2} = 2.4$ Hz, H-1b), 2.46 (s, 3 H, SMe).

^{13}C NMR (125.7 MHz, 9:1 acetone- d_6 /D $_2$ O, 313 K) δ 186.5 (CS), 139.7-125.0 (Ph), 73.4 (C-3), 72.1 (C-2), 68.1 (C-4), 64.2 (C-5), 60.4 (C-6), 46.8 (C-1), 16.5 (SMe).

ESIMS m/z 367 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$), 345 ($[\text{M} + \text{H}]^+$). Anal. Calcd. for $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}_2$: C, 48.82; H, 5.85; N, 8.13; S, 18.62. Found: C, 48.91; H, 5.73; N, 7.82; S, 18.27.

***N*-(*N'*-*p*-Fluorophenylthiocarbamoyl)-1-deoxygalactonojirimycin (28).**

Column chromatography (3:1 EtOAc-petroleum ether \rightarrow 20:1 EtOAc-EtOH \rightarrow 45:5:3 EtOAc-EtOH-H $_2$ O). Yield: 60 mg (85%). R_f 0.57 (45:5:3 EtOAc-EtOH-H $_2$ O). $[\alpha]_D - 16.2$ (c 0.77, MeOH). UV (MeOH) λ_{max} 257 nm (ϵ_{mM} 10.0).

^1H NMR (500 MHz, 9:1 acetone- d_6 /D $_2$ O) δ 7.33-6.98 (m, 4 H, Ph), 4.96 (m, 1 H, H-5), 4.71 (d, 1 H, $J_{1a,1b}$ = 14.5 Hz, H-1a), 4.15 (dd, 1 H, $J_{4,5}$ = 6.4 Hz, $J_{3,4}$ = 2.9 Hz, H-4), 4.10 (dd, 1 H, $J_{6a,6b}$ = 11.7 Hz, $J_{5,6a}$ = 8.5 Hz, H-6a), 4.00 (dd, 1 H, $J_{5,6b}$ = 3.2 Hz, H-6b), 3.90 (m, 1 H, H-2), 3.79 (m, 1 H, H-3), 3.59 (dd, 1 H, $J_{1b,2}$ = 2.3 Hz, H-1b).

^{13}C NMR (100.6 MHz, 9:1 acetone- d_6 /D $_2$ O, 313 K) δ 186.5 (CS), 127.7-115.2 (Ph), 72.5 (C-3), 71.3 (C-2), 67.4 (C-4), 63.5 (C-5), 59.8 (C-6), 46.2 (C-1).

ESIMS m/z 339 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$), 317 ($[\text{M} + \text{H}]^+$). Anal. Calcd. for C $_{13}$ H $_{17}$ FN $_2$ O $_4$ S: C, 49.36; H, 5.42; N, 8.86; S, 10.14. Found: C, 49.49; H, 5.612; N, 8.77; S, 9.89.

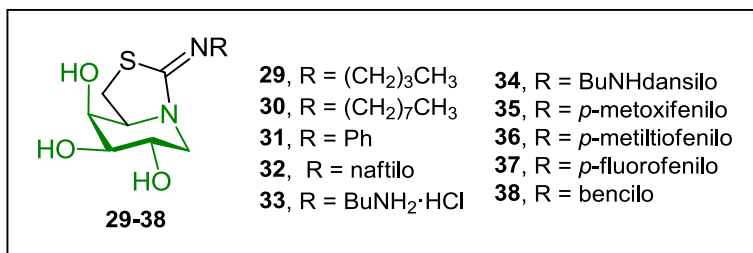
***N*-(*N*'-Benzylthiocarbamoyl)-1-deoxygalactonojirimycin (29).** Column chromatography (3:1 EtOAc- petroleum ether \rightarrow 20:1 EtOAc-EtOH \rightarrow 45:5:3 EtOAc-EtOH-H $_2$ O). Yield: 39 mg (55%). R_f 0.50 (45:5:3 EtOAc-EtOH-H $_2$ O). $[\alpha]_D - 233.7$ (c 0.99 acetone). UV (EtOH) λ_{max} 252 nm (ϵ_{mM} 15.1).

^1H NMR (300 MHz acetone- d_6) δ 7.80 (bs, 1 H, NH), 7.37-7.20 (m, 5 H, Ph), 4.85 (t, 2 H, $J_{\text{NH},\text{CH}_2}$ = 5.0 Hz, CH $_2$), 4.79 (m, 1 H, H-5), 4.71 (d, 1 H, $J_{1a,1b}$ = 14.6 Hz, H-1a), 4.40 (bs, 2 H, OH), 4.20 (bs, 1 H, OH), 4.15 (dd, 1 H, $J_{4,5}$ = 6.5 Hz, $J_{3,4}$ = 2.9 Hz, H-4), 4.09 (dd, 1 H, $J_{6a,6b}$ = 11.5 Hz, $J_{5,6a}$ = 8.5 Hz, H-6a), 4.00 (dd, 1 H, $J_{5,6b}$ = 3.5 Hz, H-6b), 3.88 (m, 1 H, H-2), 3.76 (m, 1 H, H-3), 3.62 (dd, 1 H, $J_{1b,2}$ = 2.4 Hz, H-1b), 2.95 (bs, 1 H, OH).

^{13}C NMR (75.5 MHz, acetone- d_6) δ 187.7 (CS), 140.2-127.8 (Ph), 73.4 (C-3), 72.1 (C-2), 68.1 (C-4), 63.8 (C-5), 60.1 (C-6), 50.3 (CH $_2$) 46.4 (C-1).

ESIMS m/z 335 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$), 313 ($[\text{M} + \text{H}]^+$). Anal. Calcd. for C $_{14}$ H $_{20}$ N $_2$ O $_4$ S: C, 53.83; H, 6.45; N, 8.97; S, 20.49. Found: C, 53.72; H, 6.511; N, 8.63; S, 10.98.

Preparation of bicyclic derivatives of DGJ.



To a solution of the corresponding thioureido derivative (0.15 mmol) in MeOH (6 mL), concentrated HCl was added until pH 1 (1-2 drops). The reaction mixture was stirred at rt for 12 h and the solvent was removed. The resulting residue was coevaporated several times with MeOH until neutral pH and purified by column chromatography using the eluent indicated in each case.

5-*N*,6-*S*-(*N*'-Butyliminomethylidene)-6-thio-1-deoxygalactonojirimycin (29).

Column chromatography (90:10:1 → 50:10:1 CH₂Cl₂-MeOH-H₂O). Yield: 126 mg (77%). *R_f* 0.27 (40:10:1 CH₂Cl₂-MeOH-H₂O). [α]_D + 8.1 (*c* 0.97, MeOH).

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 4.35 (dt, 1 H, *J*_{1,2} = 8.4 Hz, *J*_{2,3} = 1.3 Hz, H-2), 4.15 (dd, 1 H, *J*_{5,6a} = 5.8 Hz, *J*_{6a,6b} = 13.1 Hz, H-6a), 3.93 (m, 1 H, H-3), 3.84 (m, 1 H, H-5), 3.60 (d, 2 H, H-1), 3.50 (dd, 1 H, *J*_{3,4} = 2.8 Hz, *J*_{4,5} = 9.5 Hz, H-4), 3.34 (t, 2 H, ³*J*_{H,H} = 9.5 Hz, CH₂N), 2.90 (dd, 1 H, *J*_{5,6b} = 10.9 Hz, H-6b), 1.66 (m, 2 H, CH₂), 1.40 (m, 2 H, CH₂CH₃), 0.97 (m, 3 H, ³*J*_{H,H} = 7.3 Hz, CH₃).

¹³C NMR (125.7 MHz, CD₃OD) δ 171.7 (CS), 76.0 (C-4), 71.2 (C-3), 68.7 (C-2), 66.3 (C-5), 46.0 (CH₂N), 48.7 (C-6), 32.3 (CH₂), 29.0 (C-1), 20.8 (CH₂), 13.9 (CH₃).

FABMS *m/z* 261 (100, [M + H]⁺). Anal. Calcd for C₁₁H₂₀N₂O₃S: C, 50.75; H, 7.74; N, 10.6. Found: C, 50.66; H, 7.67; N, 10.70.

5-*N*,6-*S*-(*N*'-Octyliminomethylidene)-6-thio-1-deoxygalactonojirimycin (30).

Column chromatography (90:10:1 → 50:10:1 CH₂Cl₂-MeOH-H₂O). Yield: 113 mg (57%).

R_f 0.26 (40:10:1 CH₂Cl₂-MeOH-H₂O). [α]_D + 2.3 (*c* 1.0, MeOH).

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 4.42 (dt, 1 H, *J*_{1,2} = 8.4 Hz, *J*_{2,3} = 1.6 Hz, H-2), 4.16 (dd, 1 H, *J*_{5,6a} = 5.6 Hz, *J*_{6a,6b} = 13.1 Hz, H-6a), 3.93 (m, 1 H, H-3), 3.85 (m, 1 H, H-5), 3.63 (dd, 2 H, *J*_{1a,2} = 3.3 Hz, H-1), 3.51 (dd, 1 H, *J*_{3,4} = 2.8 Hz, *J*_{4,5} = 9.4 Hz, H-4), 3.36 (t, 2 H, ³*J*_{H,H} = 6.7 Hz, CH₂N), 2.95 (dd, 1 H, *J*_{5,6b} = 10.9 Hz, H-6b), 1.69 (m, 2 H, CH₂), 1.34 (m, 10 H, CH₂CH₃), 0.91 (t, 3 H, ³*J*_{H,H} = 7.1 Hz, CH₃).

¹³C NMR (125.7 MHz, CD₃OD) δ 172.4 (CS), 75.8 (C-4), 73.5 (C-3), 69.0 (C-2), 66.2 (C-5), 49.80 (CH₂N), 48.7 (C-6), 32.9, 30.2, 30.2, 30.1, 27.6, 23.7 (CH₂), 29.0 (C-1), 14.4 (CH₃).

FABMS *m/z* 317 (100, [M + H]⁺). Anal. Calcd for C₁₅H₂₈N₂O₃S: C, 56.93; H, 8.92; N, 8.85; S, 10.13. Found: C, 56.68; H, 8.70; N, 8.76; S, 9.87.

5-*N*,6-*S*-(*N*'-Phenyliminomethylidene)-6-thio-1-deoxygalactonojirimycin (31).

Column chromatography (90:10:1 → 50:10:1 CH₂Cl₂-MeOH-H₂O). Yield: 96 mg (40%).

R_f 0.52 (40:10:1 CH₂Cl₂-MeOH-H₂O). [α]_D − 19.2 (*c* 0.98, MeOH).

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 7.26-6.89 (m, 5 H, Ph), 4.22 (dd, 1 H, *J*_{1a,2} = 5.8 Hz, *J*_{1a,1b} = 12.6 Hz, H-1a), 3.89 (m, 2 H, H-4, H-5), 3.74 (m, 1 H, H-2), 3.46 (dd, 1 H, *J*_{3,4} = 3.0 Hz, *J*_{2,3} = 9.6 Hz, H-3), 3.37 (t, 1 H, *J*_{5,6a}, *J*_{6a,6b} = 10.4 Hz, H-6a), 3.12 (dd, 1 H, *J*_{5,6b} = 7.3 Hz, H-6b), 2.59 (dd, 1 H, *J*_{1b,2} = 12.6 Hz, H-1b).

¹³C NMR (75.5 MHz, CD₃OD) δ 165.0 (CN), 150.8-124.0 (Ph), 73.8 (C-3), 70.8 (C-4), 66.9 (C-5), 65.7 (C-2), 47.9 (C-1), 28.1 (C-6).

FABMS *m/z* 381 (30, [M + H]⁺). Anal. Calcd for C₁₃H₁₆N₂O₃S: C, 55.70; H, 5.75; N, 9.99; S, 11.44. Found: C, 55.41; H, 5.50; N, 9.62; S, 11.12.

5-*N*,6-*S*-(*N'*-Naphthyliminomethylidene)-6-thio-1-deoxygalactonojirimycin

(32). Column chromatography (80:10:1 → 40:10:1 CH₂Cl₂-MeOH-H₂O → 40:10:0.5 CH₂Cl₂-MeOH-NH₄OH). Yield: 41 mg (83%). *R_f* 0.52 (70:10:1 CH₂Cl₂-MeOH-H₂O). $[\alpha]_D - 4.67$ (*c* 1.0, MeOH).

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 7.80-7.02 (m, 7 H, naphthyl), 4.50 (dd, 1 H, $J_{1a,1b} = 12.6$ Hz, $J_{1a,2} = 5.7$ Hz, H-1a), 3.98 (m, 1 H, $J_{1b,2} = 10.7$ Hz, $J_{2,3} = 9.5$ Hz, H-2), 3.91 (m, 1 H, $J_{3,4} = 2.9$ Hz, H-4), 3.86 (ddd, 1 H, H-5), 3.53 (dd, 1 H, H-3), 3.36 (dd, 1 H, $J_{6a,6b} = 10.7$ Hz, $J_{5,6a} = 9.4$ Hz, H-6a), 3.14 (dd, 1 H, $J_{5,6b} = 7.5$ Hz, H-6b), 2.78 (dd, 1 H, H-1b).

¹³C NMR (75.5 MHz, CD₃OD) δ 164.8 (CN), 147.7-119.0 (naphthyl), 76.9 (C-3), 70.9 (C-4), 66.9 (C-5), 65.5 (C-2), 49.4 (C-1), 28.1 (C-6).

FABMS *m/z* 353 (10, [M + Na]⁺), 331 (30, [M + H]⁺). Anal. Calcd. for C₁₇H₁₈N₂O₃S: C, 61.80; H, 5.49; N, 8.48; S, 9.70. Found: C, 61.89; H, 5.37; N, 8.34; S, 9.49.

5-*N*,6-*S*-(*N'*-4-Aminobutyliminomethylidene)-6-thio-1-

deoxygalactonojirimycin hydrochloride (33). Column chromatography (8:1:1 → 6:3:1 CH₃CN-H₂O-NH₄OH). Yield: 47 mg (99%). *R_f* 0.20 (6:3:1 CH₃CN-H₂O-NH₄OH). $[\alpha]_D + 12.25$ (*c* 1.0, MeOH).

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 4.47 (m, 1 H, $J_{5,6a} = 9.0$ Hz, H-5), 4.14 (dd, 1 H, $J_{1a,1b} = 13.0$ Hz, $J_{1a,2} = 5.8$ Hz, H-1a), 4.09 (m, 1 H, $J_{3,4} = 2.9$ Hz, H-4), 3.89 (m, 1 H, $J_{1b,2} = 11.0$ Hz, $J_{2,3} = 9.7$ Hz, H-2), 3.68 (dd, 1 H, H-3), 3.69 (dd, 1 H, $J_{6a,6b} = 11.4$ Hz, H-6a), 3.59 (dd, 1 H, $J_{5,6b} = 8.2$ Hz, H-6b), 3.45 (m, 2 H, CH₂N), 3.04 (m, 2 H, CH₂NH₂), 3.02 (dd, 1 H, H-1b), 1.75 (m, 4 H, CH₂).

¹³C NMR (75.5 MHz, CD₃OD) δ 171.5 (CN), 73.6 (C-3), 69.5 (C-4), 67.1 (C-5), 64.6 (C-2), 47.6 (CH₂N), 47.0 (C-1), 38.9 (CH₂NH₂), 27.7 (C-6), 25.3, 23.8 (CH₂).

FABMS *m/z* 311 (10, [M]⁺), 276 (80, [M - Cl]⁺). Anal. Calcd. for C₁₁H₂₁N₃O₃S: C, 42.37; H, 7.11; N, 13.48; S, 10.28. Found: C, 42.05; H, 6.98; N, 13.19; S, 9.96.

5-*N*,6-*S*-(*N'*-*p*-Methylthiophenyliminomethylidene)-6-thio-1-

deoxygalactonojirimycin (35). Column chromatograph (20:1 EtOAc-EtOH → 45:5:3 EtOAc-EtOH-H₂O → 45:5:2:1 EtOAc-EtOH-H₂O-NH₄OH). Yield: 34 mg (66%). *R_f* 0.42 (45:5:3 EtOAc-EtOH-H₂O). $[\alpha]_D - 46.1$ (*c* 0.79, EtOH).

¹H NMR (500 MHz, 9:1 acetone-*d*₆/D₂O) δ 7.19-6.83 (m, 4 H, Ph), 4.32 (dd, 1 H, *J*_{1a,1b} = 12.5 Hz, *J*_{1a,2} = 5.6 Hz, H-1a), 3.95 (m, 1 H, H-4), 3.88 (m, 1 H, H-2), 3.75 (ddd, 1 H, H-5), 3.50 (dd, 1 H, *J*_{2,3} = 9.4 Hz, *J*_{3,4} = 2.9 Hz, H-3), 3.43 (dd, 1 H, *J*_{5,6a} = 10.3 Hz, H-6a), 3.18 (dd, 1 H, *J*_{6a,6b} = 10.5 Hz, *J*_{5,6b} = 7.3 Hz, H-6b), 2.55 (dd, 1 H, *J*_{1b,2} = 10.6 Hz, H-1b), 2.43 (s, 3 H, SMe).

¹³C NMR (125.7 MHz, 9:1 acetone-*d*₆/D₂O) δ 160.1 (CN), 150.7-123.4 (Ph), 76.7 (C-3), 69.9 (C-4), 66.6 (C-5), 66.8 (C-2), 48.9 (C-1), 27.6 (C-6), 16.7 (SMe).

ESIMS *m/z* 349 ([M + Na]⁺), 327 ([M + H]⁺). Anal. Calcd. for C₁₄H₁₈N₂O₃S₂: C, 51.51; H, 5.56; N, 8.58; S, 19.65. Found: C, 51.59; H, 5.852; N, 8.28; S, 19.23.

5-*N*,6-*S*-(*N'*-*p*-Methoxyphenyliminomethylidene)-6-thio-1-

deoxygalactonojirimycin (36). Column chromatography (EtOAc → 20:1 EtOAc-EtOH → 45:5:3 EtOAc-EtOH-H₂O). Yield: 30 mg (64%). *R_f* 0.42 (45:5:3 EtOAc-EtOH-H₂O). $[\alpha]_D + 5.33$ (*c* 0.72, MeOH).

¹H NMR (500 MHz, acetone-*d*₆) δ 7.78-7.67 (m, 4 H, Ph), 4.35 (dd, 1 H, *J*_{1a,1b} = 12.1 Hz, *J*_{1a,2} = 5.8 Hz, H-1a), 3.98 (m, 1 H, H-4), 3.91 (m, 1 H, H-2), 3.77 (s, 3 H, OCH₃), 3.74 (ddd, 1 H, *J*_{5,6a} = 9.6 Hz, *J*_{5,6b} = 7.1 Hz, *J*_{5,4} = 1.8 Hz, H-5), 3.52 (dd, 1 H, *J*_{2,3} = 9.4 Hz, *J*_{3,4} = 3.0 Hz, H-3), 3.43 (dd, 1 H, *J*_{6a,6b} = 10.5 Hz, H-6a), 3.17 (dd, 1 H, H-6b), 2.57 (dd, 1 H, *J*_{1b,2} = 10.6 Hz, H-1b).

¹³C NMR (125.7 MHz, acetone-*d*₆) δ 168.0 (CN), 160.2-129.6 (Ph), 76.8 (C-3), 69.9 (C-4), 66.6 (C-5), 63.8 (C-2), 60.2 (OMe), 48.9 (C-1), 27.6 (C-6).

ESIMS *m/z* 311 ([M + H]⁺). HRMS C₁₄H₁₉N₂O₄S found 311.1066, (M + Na)⁺ requires 311.1058.

5-*N*,6-*S*-(*N'*-*p*-Fluorophenyliminomethylidene)-6-thio-1-deoxygalactonojirimycin (37). Column chromatography (20:1 EtOAc-EtOH → 45:5:3 EtOAc-EtOH-H₂O → 45:5:2:1 EtOAc-EtOH-H₂O-NH₄OH). Yield: 21 mg (45%). *R_f* 0.35 (45:5:3 EtOAc-EtOH-H₂O). $[\alpha]_D - 8.3$ (*c* 0.82, EtOH).

¹H NMR (500 MHz, 9:1 acetone-*d*₆/D₂O) δ 6.98-6.84 (dd, 4 H, Ph), 4.27 (dd, 1 H, *J*_{1a,1b} = 12.6 Hz, *J*_{1a,2} = 5.7 Hz, H-1a), 3.94 (m, 1 H, H-4), 3.87 (m, 1 H, H-2), 3.74 (dd, 1 H, *J*_{5,6a} = 9.2 Hz, *J*_{6a,6b} = 10.5 Hz, H-6a), 3.51 (dd, 1 H, *J*_{2,3} = 9.5 Hz, *J*_{3,4} = 2.9 Hz, H-3), 3.36 (ddd, 1 H, H-5), 3.16 (dd, 1 H, *J*_{5,6b} = 7.3 Hz, H-6b), 2.56 (dd, 1 H, *J*_{1b,2} = 10.7 Hz, H-1b).

¹³C NMR (125.7 MHz, 9:1 acetone-*d*₆/D₂O) δ 161.1 (CN), 160.6-115.7 (Ph), 76.3 (C-3), 69.8 (C-4), 66.3 (C-5), 63.9 (C-2), 48.6 (C-1), 27.5 (C-6).

ESIMS *m/z* 341 ([M + Na]⁺), 299 ([M + H]⁺). Anal. Calcd. for C₁₃H₁₅FN₂O₃S: C, 52.34; H, 5.07; N, 9.39; S, 10.75. Found: C, 52.13; H, 4.84; N, 9.07; S, 10.39.

5-*N*,6-*S*-(*N'*-Benzyliminomethylidene)-6-thio-1-deoxygalactonojirimycin (38). Column chromatography (20:1 EtOAc-EtOH → 45:5:3 EtOAc-EtOH-H₂O). Yield: 37 mg (83%). *R_f* 0.12 (45:5:3 EtOAc-EtOH-H₂O). $[\alpha]_D + 10.6$ (*c* 1, EtOH).

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 7.47-7.26 (m, 5 H, Ph), 4.50 (CH₂Ph), 4.22 (dd, 1 H, *J*_{1a,1b} = 12.9 Hz, *J*_{1a,2} = 5.7 Hz, H-1a), 4.19 (dd, 1 H, *J*_{2,3} = 8.4 Hz, *J*_{3,4} = 1.5 Hz, H-3), 3.93 (m, 1 H, H-4), 3.87 (m, 1 H, H-2), 3.56 (dd, 1 H, *J*_{6a,6b} = 11.0 Hz, *J*_{5,6a} = 8.4 Hz, H-6a), 3.51 (m, 1 H, H-5), 3.50 (dd, 1 H, *J*_{5,6b} = 8.4 Hz, H-6b), 2.55 (dd, 1 H, *J*_{1b,2} = 10.8 Hz, H-1b).

¹³C NMR (75.5 MHz, CD₃OD) δ 170.4 (CN), 138.0-128.7 (Ph), 76.1 (C-3), 71.1 (C-4), 68.0 (C-5), 66.5 (C-2), 54.4 (CH₂), 49.1 (C-1), 29.0 (C-6).

ESIMS *m/z* 295 ([M + H]⁺). HRMS C₁₄H₁₉N₂O₃S found 295.1124, (M + Na)⁺ requires 295.1116.

5-*N*,6-*S*-(*N*'-4-Dansylaminobutyliminomethyliden)-6-thio-1-

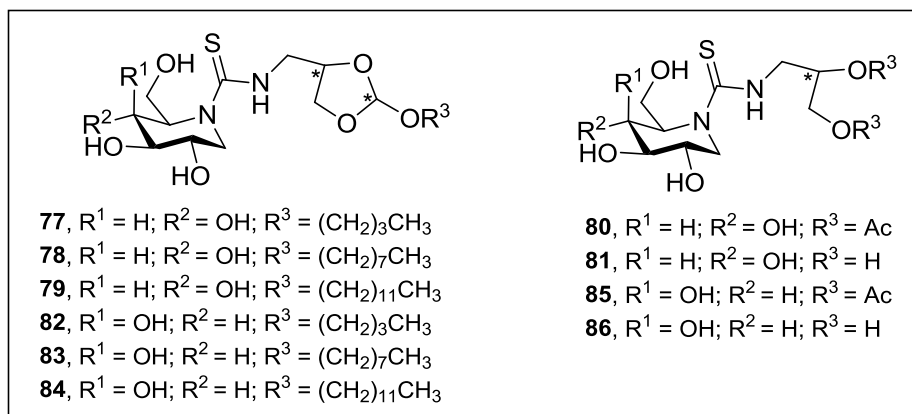
deoxygalactonojirimycin (34). To a solution of **33** (22.8 mg, 0.073 mmol) in DMF (5 mL) and Et₃N (23 μ L, 0.161 mmol), dansyl chloride (16 mg, 0.058 mmol) was added and the reaction mixture was stirred at 0 °C for 24 h. Then the solvent was concentrated under reduced pressure and the resulting residue was purified by column chromatography (90:10:1 \rightarrow 80:10:1 CH₂Cl₂-MeOH-H₂O). Yield: 28 mg (76%). R_f 0.19 (CH₂Cl₂-MeOH-H₂O 40:10:1). [α]_D + 0.48 (*c* 1.0, H₂O).

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 8.60-7.28 (m, 6 H, dansyl), 4.32 (dd, 1 H, *J*_{5,6b} = 8.9 Hz, *J*_{5,6a} = 8.1 Hz, H-5), 4.10 (dd, 1 H, *J*_{1a,1b} = 13.0 Hz, *J*_{1a,2} = 5.8 Hz, H-1a), 3.92 (m, 1 H, *J*_{3,4} = 2.8 Hz, H-4), 3.85 (m, 1 H, *J*_{2,3} = 9.4 Hz, H-2), 3.58 (dd, 1 H, *J*_{6a,6b} = 11.0 Hz, H-6a), 3.55 (dd, 1 H, H-6b), 3.49 (dd, 1 H, H-3), 3.21 (t, 2 H, CH₂N=), 2.88 (m, 3 H, H-1b, CH₂NHSO₂), 1.61 (m, 2 H, CH₂), 1.46 (m, 2 H, CH₂).

¹³C NMR (75.5 MHz, CD₃OD) δ 171.8 (CN), 153.2-116.4 (dansyl), 75.9 (C-3), 71.2 (C-4), 68.8 (C-5), 66.2 (C-2), 49.5 (CH₂N=), 49.0 (C-1), 45.8 (NMe₂), 43.2 (CH₂NH₂), 28.9 (C-6), 27.6, 27.0 (CH₂).

FABMS *m/z* 531 (30, [M + Na]⁺), 509 (100, [M + H]⁺). Anal. Calcd. for C₂₃H₃₂N₄O₅S: C, 54.31; H, 6.34; N, 11.01; S, 12.61. Found: C, 53.97; H, 6.123; N, 10.74; S, 12.30.

Preparation of pH-sensitive iminosugar derivatives of DNJ and DGJ.



To a solution of DGJ hydrochloride or DNJ hydrochloride (45 mg, 0.225 mmol) in pyridine (5 mL), Et_3N (70 μL , 0.495 mmol) and the corresponding isothiocyanate (0.248 mmol) were added. The mixture was stirred at rt for 18 h and concentrated. The resulting residue coevaporated several times with toluene and purified by column chromatography using the eluent indicated in each case.

***N*-(*N'*-(2-Butyloxy-[1,3]dioxolan-4-ylmethyl)thiocarbamoyl)-1-deoxygalactonojirimycin (82).** Column chromatography, eluent 3:1 EtOAc-cyclohexane \rightarrow EtOAc \rightarrow 20:1 EtOAc-EtOH \rightarrow 45:5:3 EtOAc-EtOH- H_2O . Yield: 60 mg (70%). R_f 0.44 (45:5:3 EtOAc-EtOH- H_2O). $[\alpha]_D - 68.6$ (c 1, EtOH). UV (EtOH) 244 nm (ϵ_{mM} 11.2).

^1H NMR (500 MHz, acetone- d_6 , 313 K) δ 7.55, 7.48 (bs, 4 H, NH), 5.85, 5.80, 5.78, 5.77 (s, 4 H, H-10), 4.83-4.62 (m, 8 H, H-1a, H-5), 4.54, 4.41 (m, 4 H, H-8), 4.20-3.95 (m, 8 H, H-6a, H-6b), 4.13 (m, 4 H, H-4), 3.99-3.69 (m, 16 H, H-7, H-9), 3.88 (m, 4 H, H-2), 3.74 (m, 4 H, H-3), 3.57-3.47 (m, 8 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.61, 3.59 (m, 4 H, H-1b), 1.54 (m, 8 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 1.37 (m, 8 H, CH_2), 0.92, 0.90 (t, 12 H, CH_3).

^{13}C NMR (125.7 MHz, acetone- d_6 , 313 K) δ 190.7, 188.2, 187.8, 187.6 (CS), 116.7, 116.6, 116.2, 116.1 (C-10), 76.0, 75.7, 75.0 (C-8), 73.5, 73.4, 73.3 (C-3), 72.2, 72.1, 72.0 (C-2), 68.1, 67.9 (C-4), 66.9, 66.8, 66.7, 66.4 (C-9), 65.0, 64.8, 64.3, 64.2

(CH₂CH₂O), 63.9, 63.7, 63.6, 62.9 (C-5), 60.0 (C-6), 49.6-48.3 (CH₂NH), 46.5, 46.3, 45.9 (C-1), 32.4, 20.0 (CH₂), 14.1, 14.0 (CH₃).

ESIMS: m/z 403 ([M + Na]⁺). HRMS: C₁₅H₂₈N₂O₇NaS found 403.1509, (M + Na)⁺ requires 403.1515.

***N*-(*N'*-(2-Octyloxy-[1,3]dioxolan-4-ylmethyl)thiocarbamoyl)-1-**

deoxygalactonojirimycin (83). Column chromatography, eluent 3:1 EtOAc-cyclohexane → EtOAc → 20:1 EtOAc-EtOH → 45:5:3 EtOAc-EtOH-H₂O. Yield: 69 mg (70%). R_f 0.59 (45:5:3 EtOAc-EtOH-H₂O). $[\alpha]_D - 114.8$ (*c* 1, acetone). UV (EtOH) 250 nm (ϵ_{mM} 8.9).

¹H NMR (500 MHz, acetone-*d*₆, 323 K) δ 7.57, 7.49 (bs, 4 H, NH), 5.85, 5.80, 5.78, 5.77 (s, 4 H, H-10), 4.85-4.62 (m, 4 H, H-5), 4.64 (m, 4 H, H-1a), 4.54, 4.41 (m, 4 H, H-8), 4.18, 4.14 (m, 4 H, H-4), 4.10-3.91 (m, 16 H, H-6a, H-6b, H-7a, H-9a), 3.89-3.70 (m, 12 H, H-3, H-7b, H-9b), 3.89 (m, 4 H, H-2), 3.64, 3.61 (m, 4 H, H-1b), 3.59-3.48 (m, 8 H, CH₂CH₂O), 1.57 (m, 8 H, CH₂CH₂O), 1.34 (m, 40 H, CH₂), 0.89 (t, 12 H, CH₃).

¹³C NMR (125.7 MHz, acetone-*d*₆, 323 K) δ 186.2 (CS), 116.7, 116.2 (C-10), 76.0, 75.7, 75.0 (C-8), 73.4, 73.3 (C-3), 72.2, 72.0 (C-2), 68.1, 68.0 (C-4), 67.0, 66.8, 66.7, 66.5 (C-9), 65.4, 65.2, 64.7, 64.6 (CH₂CH₂O), 64.2, 64.0, 63.7, 63.6 (C-5), 60.0 (C-6), 49.4, 48.7, 48.6, 48.5 (CH₂NH), 46.5, 46.3 (C-1), 32.6, 26.9, 23.3 (CH₂), 14.3 (CH₃).

ESIMS: m/z 459 ([M + Na]⁺). HRMS: C₁₉H₃₆N₂O₇NaS found 459.2137, (M + Na)⁺ requires 459.2121.

***N*-(*N'*-(2-Dodecyloxy-[1,3]dioxolan-4-ylmethyl)thiocarbamoyl)-1-**

deoxygalactonojirimycin (84). Column chromatography, eluent 3:1 EtOAc-cyclohexane → EtOAc → 20:1 EtOAc-EtOH → 45:5:3 EtOAc-EtOH-H₂O. Yield: 80 mg (72%). R_f 0.67 (45:5:3 EtOAc-EtOH-H₂O). $[\alpha]_D - 90.3$ (*c* 1, EtOH). UV (EtOH) 249 nm (ϵ_{mM} 10.5).

^1H NMR (500 MHz, acetone- d_6 , 313 K) δ 7.57, 7.49 (bs, 4 H, NH), 5.85, 5.80, 5.78, 5.77 (s, 4 H, H-10), 4.83-4.61 (m, 4 H, H-5), 4.66 (m, 4 H, H-1a), 4.54, 4.41 (m, 4 H, H-8), 4.12 (m, 4 H, H-4), 4.12-3.96 (m, 8 H, H-6a, H-6b), 4.12-3.73 (m, 8 H, H-9a, H-9b), 3.98-3.68 (m, 8 H, H-7a, H-7b), 3.88 (m, 4 H, H-2), 3.62, 3.59 (m, 4 H, H-1b), 3.58-3.48 (m, 8 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 1.57 (m, 8 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 1.30 (m, 72 H, CH_2), 0.88 (t, 12 H, CH_3).

^{13}C NMR (125.7 MHz, acetone- d_6 , 313 K) δ 188.3, 188.0, 187.8, 187.6 (CS), 116.7, 116.6, 116.2, 116.1 (C-10), 76.0, 75.7, 75.0 (C-8), 73.5, 73.5, 73.4, 73.3 (C-3), 72.2, 72.1, 72.0 (C-2), 68.1, 68.0, 67.9 (C-4), 66.9, 66.8, 66.7, 66.4 (C-9), 65.3, 65.1, 64.7, 64.5 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 64.2, 64.0, 63.7, 63.6 (C-5), 60.0 (C-6), 49.3, 48.7, 48.6, 48.4 (CH_2NH), 46.5, 46.4, 46.3 (C-1), 32.6, 26.9, 23.3 (CH_2), 14.3 (CH_3).

ESIMS: m/z 515 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$). HRMS: $\text{C}_{23}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{O}_7\text{NaS}$ found 515.2747, ($\text{M} + \text{Na}$) $^+$ requires 515.2767.

***N*-(*N'*-(2-Butyloxy-[1,3]dioxolan-4-ylmethyl)thiocarbamoyl)-1-deoxynojirimycin (77).** Column chromatography, eluent 3:1 EtOAc-cyclohexane \rightarrow EtOAc \rightarrow 20:1 EtOAc-EtOH \rightarrow 45:5:3 EtOAc-EtOH- H_2O . Yield: 66 mg (77%). R_f 0.59 (45:5:3 EtOAc-EtOH- H_2O). $[\alpha]_D - 86.2$ (c 1, acetone). UV (EtOH) 248 nm (ϵ_{mM} 9.8).

^1H NMR (500 MHz, acetone- d_6 , 313 K) δ 7.55, 7.48 (bs, 4 H, NH), 5.85, 5.81, 5.78, 5.77 (s, 4 H, H-10), 4.67 (dd, 4 H, $J_{1a,1b} = 14.2$ Hz, $J_{1a,2} = 5.6$ Hz, H-1a), 4.58-4.39 (m, 8 H, H-5, H-8), 4.11-3.70 (m, 8 H, H-9a, H-9b), 4.01-3.91 (m, 8 H, H-6a, H-6b), 4.01-3.70 (m, 8 H, H-7a, H-7b), 3.79 (m, 4 H, H-2), 3.67-3.61 (m, 8 H, H-3, H-4), 3.58-3.47 (m, 12 H, H-1b, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 1.60 (m, 8 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 1.46 (m, 8 H, CH_2), 0.93 (t, 12 H, CH_3).

^{13}C NMR (125.7 MHz, acetone- d_6 , 313 K) δ 188.3, 188.1, 187.9, 187.8 (CS), 116.7, 116.3, 116.2 (C-10), 76.0, 75.7, 75.0, 74.9 (C-8), 74.4, 74.0 (C-3), 73.6, 73.5, 73.3

(C-2), 71.0, 70.9 (C-4), 67.1-66.4 (C-5, C-9), 64.9, 64.7, 64.3, 64.2 (CH₂CH₂O), 62.1, 62.0 (C-6), 49.4-48.3 (CH₂NH), 47.8, 47.7, 47.5 (C-1), 32.4, 20.0 (CH₂), 14.0 (CH₃).

ESIMS: m/z 403 ([M + Na]⁺). HRMS: C₁₅H₂₈N₂O₇NaS found 403.1508, (M + Na)⁺ requires 403.1515.

***N*-(*N'*-(2-Octyloxy-[1,3]dioxolan-4-ylmethyl)thiocarbamoyl)-1-**

deoxynojirimycin (78). Column chromatography, eluent 3:1 EtOAc-cyclohexane → EtOAc → 20:1 EtOAc-EtOH → 45:5:3 EtOAc-EtOH-H₂O. Yield: 61 mg (62%). R_f 0.60 (45:5:3 EtOAc-EtOH-H₂O). $[\alpha]_D - 86.5$ (c 1, acetone). UV (EtOH) 249 nm (ϵ_{mM} 5.2).

¹H NMR (500 MHz, acetone-*d*₆, 313 K) δ 7.55, 7.48 (bs, 4 H, NH), 5.85, 5.81, 5.78, 5.77 (s, 4 H, H-10), 4.67 (d, 4 H, $J_{1a,1b} = 14.7$ Hz, H-1a), 4.58-4.39 (m, 8 H, H-5, H-8), 4.11-4.03 (m, 4 H, H-9a), 4.00-3.92 (m, 12 H, H-6a, H-6b, H-7a), 3.88-3.73 (m, 8 H, H-7b, H-9b), 3.78 (m, 4 H, H-2), 3.67-3.61 (m, 8 H, H-3, H-4), 3.57-3.47 (m, 12 H, H-1b, CH₂CH₂O), 1.56 (m, 8 H, CH₂CH₂O), 1.31 (m, 40 H, CH₂), 0.88 (t, 12 H, CH₃).

¹³C NMR (125.7 MHz, acetone-*d*₆, 313 K) δ 188.3, 188.1, 188.0, 187.8 (CS), 116.7, 116.3, 116.2 (C-10), 76.0, 75.7, 75.0, 74.9 (C-8), 74.4, 74.0 (C-3), 73.6, 73.6, 73.5, 73.3 (C-2), 71.1, 71.1 (C-4), 67.1-66.8 (C-5, C-9), 65.3, 65.1, 64.5, 64.3 (CH₂CH₂O), 62.1, 62.0 (C-6), 49.4-48.3 (CH₂NH), 47.8, 47.7, 47.5 (C-1), 32.6, 26.9, 23.3 (CH₂), 14.4 (CH₃).

ESIMS: m/z 459 ([M + Na]⁺). HRMS: C₁₉H₃₆N₂O₇NaS found 459.2161, (M + Na)⁺ requires 459.2141.

***N*-(*N'*-(2-Dodecyloxy-[1,3]dioxolan-4-ylmethyl)thiocarbamoyl)-1-**

deoxynojirimycin (79). Column chromatography, eluent 3:1 EtOAc-cyclohexane → EtOAc → 20:1 EtOAc-EtOH → 45:5:3 EtOAc-EtOH-H₂O. Yield: 88 mg (79%). $R_f = 0.66$ (45:5:3 EtOAc-EtOH-H₂O). $[\alpha]_D - 121.6$ (c 1, acetone). UV (EtOH) 250 nm (ϵ_{mM} 11.6).

^1H NMR (500 MHz, acetone- d_6 , 313 K) δ 7.65, 7.59 (bs, 4 H, NH), 5.85, 5.81, 5.78, 5.77 (s, 4 H, H-10), 4.67 (d, 4 H, $J_{1a,1b}$ = 14.5 Hz, H-1a), 4.58-4.39 (m, 8 H, H-5, H-8), 4.11-4.04 (m, 4 H, H-9a), 3.99-3.92 (m, 12 H, H-6a, H-6b, H-7a), 3.89-3.76 (m, 8 H, H-7b, H-9b), 3.78 (m, 4 H, H-2), 3.67-3.62 (m, 8 H, H-3, H-4), 3.58-3.47 (m, 12 H, H-1b, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 1.56 (m, 8 H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 1.30 (m, 72 H, CH_2), 0.88 (t, 12 H, CH_3).

^{13}C NMR (125.7 MHz, acetone- d_6 , 313 K) δ 187.7 (CS), 116.5, 116.2, 116.1 (C-10), 75.9, 75.6, 75.0, 74.8 (C-8), 74.4-73.9 (C-3), 73.4, 73.2, 73.1 (C-2), 70.9, 70.8 (C-4), 67.0-66.3 (C-5, C-9), 65.2, 65.0, 64.6, 64.5 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 62.0 (C-6), 49.3-48.2 (CH_2NH), 47.7, 47.6, 47.5 (C-1), 32.6, 26.9, 23.3 (CH_2), 14.4 (CH_3).

ESIMS: m/z 515 ($[\text{M} + \text{Na}]^+$). HRMS: $\text{C}_{23}\text{H}_{44}\text{N}_2\text{O}_7\text{Na}$ found 515.2781, ($\text{M} + \text{Na}$) $^+$ requires 515.2767.

***N*-(*N*'-2,3-Diacetoxypropylthiocarbamoyl)-1-deoxygalactonojirimycin (85).**

To a solution of DGJ hydrochloride (45 mg, 0.225 mmol) in pyridine (5 mL), Et_3N (70 μL , 0.495 mmol) and (\pm)-2,3-diacetoxy-1-propylisothiocyanate (**74**) 0.248 mmol, 1.1 eq were added. The mixture was stirred at rt for 18 h and concentrated. The resulting residue coevaporated several times with toluene and purified by column chromatography using 3:1 EtOAc-cyclohexane \rightarrow EtOAc \rightarrow 20:1 EtOAc-EtOH \rightarrow 45:5:3 EtOAc-EtOH- H_2O as eluent. Yield: 69 mg (81%). R_f 0.48 (45:5:3 EtOAc-EtOH- H_2O). $[\alpha]_D - 6.7$ (c 1, EtOH). UV (EtOH) 245 nm (ϵ_{mM} 10.6).

^1H NMR (500 MHz, 9:1 acetone- $d_6/\text{D}_2\text{O}$, 313 K) δ 5.26 (m, 2 H, H-8), 4.69 (m, 2 H, H-5), 4.61 (dd, 2 H, $J_{1a,1b}$ = 14.6 Hz, $J_{1a,2}$ = 6.6 Hz, H-1a), 4.30 (dd, 1 H, J_{gem} = 12.1 Hz, $J_{8,9a}$ = 3.6 Hz, H-9a), 4.29 (dd, 1 H, J_{gem} = 12.0 Hz, $J_{8,9a'}$ = 3.9 Hz, H-9a'), 4.13 (dd, 2 H, J_{gem} = 12.0 Hz, $J_{8,9b} = J_{8,9b'}$ = 3.8 Hz, H-9b, H-9b'), 4.09, 4.08 (dd, 2 H, $J_{4,5}$ = 6.5 Hz, $J_{3,4}$ = 2.9 Hz, H-4), 4.07-3.93 (m, 8 H, H-6a, H-6b), 3.99-3.70 (m, 6 H, H-7a, H-7a', H-6a, H-6b), 3.85 (m, 2 H, H-2), 3.79 (dd, 2 H, J_{gem} = 14.0 Hz, $J_{7b,8} = J_{7b',8} = 7.3$ Hz, H-7b, H-7b'), 3.71 (m, 2 H, H-3), 3.56, 3.55 (dd, 2 H, $J_{1b,2}$ = 2.4 Hz, H-1b), 2.00 (s, 12 H, CH_3CO).

^{13}C NMR (125.7 MHz, 9:1 acetone- d_6 /D $_2$ O, 313 K) δ 187.2 (CS), 171.3, 171.2 (CO), 72.9 (C-3), 71.7 (C-2), 71.3, 71.2 (C-8), 67.7 (C-4), 63.9, 63.8 (C-9), 63.4 (C-5), 59.8 (C-6), 46.5, 46.4, 46.3 (C-1, C-7), 20.9, 20.6 (CH $_3$ CO). ESIMS: m/z 403 ([M + Na] $^+$). HRMS: C $_{14}$ H $_{24}$ N $_2$ O $_8$ NaS found 403.1153, (M + Na) $^+$ requires 403.1151.

***N*-(*N'*-2,3-Diacetoxypropylthiocarbamoyl)-1-deoxynojirimycin (80).** To a solution of DNJ hydrochloride (45 mg, 0.225 mmol) in pyridine (5 mL), Et $_3$ N (70 μ L, 0.495 mmol) and (\pm)-2,3-diacetoxy-1-propylisothiocyanate **74** (0.248 mmol, 1.1 eq) were added. The mixture was stirred at rt for 18 h and concentrated. The resulting residue coevaporated several times with toluene and purified by column chromatography using 3:1 EtOAc-cyclohexane \rightarrow EtOAc \rightarrow 20:1 EtOAc-EtOH \rightarrow 45:5:3 EtOAc-EtOH-H $_2$ O. Yield: 59 mg (69%). R_f 0.48 (45:5:3 EtOAc-EtOH-H $_2$ O). $[\alpha]_D - 120.8$ (c 0.8, EtOH). UV (EtOH) 252 nm (ϵ_{mM} 10.0).

^1H NMR (500 MHz, 9:1 acetone- d_6 /D $_2$ O, 313 K) δ 5.28 (m, 2 H, H-8), 4.61 (d, 2 H, $J_{1a,1b} = 14.6$ Hz, H-1a), 4.42 (m, 2 H, H-5), 4.31 (dd, 1 H, $J_{\text{gem}} = 12.0$ Hz, $J_{8,9a} = 3.6$ Hz, H-9a), 4.30 (dd, 1 H, $J_{\text{gem}} = 12.0$ Hz, $J_{8,9a'} = 3.8$ Hz, H-9a'), 4.14, 4.13 (dd, 2 H, $J_{\text{gem}} = 12.0$ Hz, $J_{8,9b} = J_{8,9b'} = 5.8$ Hz, H-9b, H-9b'), 4.02 (dd, 1 H, $J_{\text{gem}} = 14.0$ Hz, $J_{7a,8} = 5.0$ Hz, H-7a), 3.98 (dd, 1 H, $J_{\text{gem}} = 14.1$ Hz, $J_{7a',8} = 4.3$ Hz, H-7a'), 3.89 (m, 4 H, H-6a, H-6b), 3.79 (dd, 1 H, $J_{\text{gem}} = 14.1$ Hz, $J_{7b,8} = 7.4$ Hz, H-7b), 3.74 (m, 2 H, H-2), 3.73 (dd, 1 H, $J_{\text{gem}} = 14.0$ Hz, $J_{7b',8} = 7.1$ Hz, H-7b'), 3.64 (m, 2 H, H-4), 3.60 (m, 2 H, H-3), 3.52 (dd, 2 H, $J_{1b,2} = 3.1$ Hz, H-1b), 2.01, 2.00 (s, 12 H, CH $_3$ CO).

^{13}C NMR (125.7 MHz, 9:1 acetone- d_6 /D $_2$ O, 313 K) δ 187.5 (CS), 171.1, 170.9 (CO), 73.8 (C-3), 73.0 (C-2), 71.3, 71.1 (C-8), 70.7 (C-4), 66.5 (C-5), 63.9, 63.8 (C-9), 61.9 (C-6), 47.7 (C-1), 46.5, 46.4 (C-7), 20.9, 20.6 (CH $_3$ CO).

ESIMS: m/z 403 ([M + Na] $^+$). HRMS: C $_{14}$ H $_{24}$ N $_2$ O $_8$ NaS found 403.1153, (M + Na) $^+$ requires 403.1151.

***N*-(*N*'-2,3-Dihydroxypropylthiocarbamoyl)-1-deoxygalactonojirimycin (86).**

N-(*N*'-2,3-Diacetoxypropylthiocarbamoyl)-1-deoxygalactonojirimycin **85** (67 mg, 0.176 mmol) was dissolved in MeOH and 1 M MeONa (until pH 8-9) was added. The mixture reaction was stirred at rt for 1.5 h until total conversion of starting material. Then, the mixture reaction was diluted with MeOH and neutralised with CO₂. The solvent was concentrated and the resulting residue was purified by column chromatography using 20:1 EtOAc-EtOH → 45:5:3 EtOAc-EtOH-H₂O → 45:5:1:2 EtOAc-EtOH-H₂O-NH₄OH as eluent. Yield: 52 mg (quantitative). *R*_f 0.12 (45:5:3 EtOAc-EtOH-H₂O). [α]_D – 133.2 (c 1.0, EtOH). UV (EtOH) 249 nm (ε_{mM} 9.66).

¹H NMR (500 MHz, 9:1 acetone-*d*₆/D₂O, 313 K) 4.87 (m, 2 H, H-5), 4.56 (d, 2 H, *J*_{1a,1b} = 14.7 Hz, H-1a), 4.09, 4.08 (dd, 2 H, *J*_{4,5} = 6.4 Hz, *J*_{3,4} = 3.0 Hz, H-4), 4.02, 4.01 (dd, 2 H, *J*_{6a,6b} = 11.8 Hz, *J*_{6a,5} = 8.1 Hz, H-6a), 3.93, 3.92 (dd, 2 H, *J*_{6b,5} = 3.7 Hz, H-6b), 3.87 (m, 2 H, H-2), 3.85 (m, 2 H, H-8), 3.79 (m, 2 H, H-7a, H-7a'), 3.75 (m, 2 H, H-3), 3.62 (dd, 1 H, *J*_{gem} = 13.7 Hz, *J*_{7b,8} = 6.8 Hz, H-7b), 3.61 (dd, 1 H, *J*_{gem} = 13.7 Hz, *J*_{7b',8} = 6.5 Hz, H-7b'), 3.54 (dd, 2 H, *J*_{1b,2} = 2.3 Hz, H-1b), 3.49 (m, 4 H, H-9).

¹³C NMR (125.7 MHz, 9:1 acetone-*d*₆/D₂O, 313 K) δ 185.8 (CS), 72.2 (C-3), 71.2 (C-2), 71.1 (C-8), 67.2 (C-4), 64.3 (C-9), 62.7 (C-5), 59.3 (C-6), 49.1 (C-7), 45.9 (C-1).

ESIMS: *m/z* 319 ([M + Na]⁺). HRMS: C₁₀H₂₀N₂O₆NaS found 319.0940, (M + Na)⁺ requires 319.0940.

***N*-(*N*'-2,3-Dihydroxypropylthiolthiocarbamoyl)-1-deoxynojirimycin (81).**

N-(*N*'-2,3-Diacetoxypropylthiocarbamoyl)-1-deoxynojirimycin **80** (67 mg, 0.176 mmol) was dissolved in MeOH and 1 M MeONa (until pH 8-9) was added. The mixture reaction was stirred at rt for 1.5 h. Then, the mixture reaction was diluted with MeOH and neutralised with CO₂. The solvent was concentrated and the resulting residue was purified by column chromatography using 20:1 EtOAc-EtOH → 45:5:3 EtOAc-EtOH-H₂O →

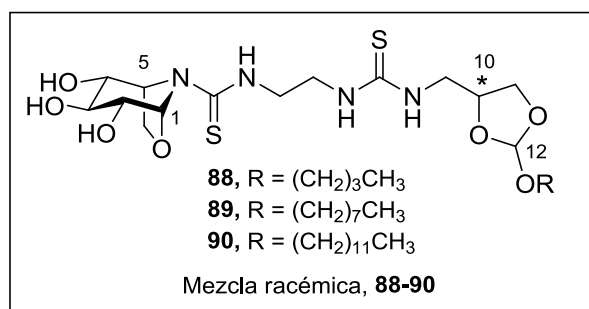
45:5:1:2 EtOAc-EtOH-H₂O-NH₄OH as eluent. Yield: 45 mg (86%). R_f 0.12 (45:5:3 EtOAc-EtOH-H₂O). $[\alpha]_D - 88.1$ (c 1.0, EtOH). UV (EtOH) 248 nm (ϵ_{mM} 6.6).

¹H NMR (500 MHz, 9:1 acetone-*d*₆/D₂O, 313 K) 4.62 (d, 2 H, $J_{1a,1b} = 14.8$ Hz, H-1a), 3.92 (m, 2 H, H-5), 3.91, 3.90 (dd, 2 H, $J_{6a,6b} = 11.5$ Hz, $J_{6a,5} = 7.3$ Hz, H-6a), 3.89 (dd, 2 H, $J_{6b,5} = 4.1$ Hz, H-6b), 3.83 (m, 3 H, H-7a, H-7a', H-8), 3.77 (m, 2 H, H-2), 3.69 (m, 2 H, H-4), 3.63 (m, 3 H, H-3, H-7b, H-7b'), 3.50 (m, 6 H, H-1a, H-9a, H-9a', H-9b, H-9b').

¹³C NMR (125.7 MHz, 9:1 acetone-*d*₆/D₂O, 313 K) δ 186.7 (CS), 73.2, 73.1 (C-3), 72.6 (C-2), 71.4 (C-8), 70.6 (C-4), 66.0 (C-5), 64.5 (C-9), 61.6 (C-6), 49.2 (C-7), 47.5 (C-1).

ESIMS: m/z 319 ($[M + Na]^+$). HRMS: C₁₀H₂₀N₂O₆NaS found 319.0940, ($M + Na$)⁺ requires 319.0940.

Preparation of pH-sensitive iminosugar derivatives of 6-oxacalisterine B₂.



To a solution of (1*S*,2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-*N*-(*N*'-2-aminoethylthiocarbonyl)-2,3,4-trihydroxy-6-oxa-*nor*-tropane hydrochloride **87**²⁴ (45 mg, 0.225 mmol) in pyridine (5 mL), Et₃N (70 μ L, 0.495 mmol) and the corresponding isothiocyanate (0.248 mmol, 1.1 eq) were added. The mixture was stirred at room temperature for 18 h and concentrated. The resulting residue coevaporated several times with toluene and purified by column chromatography using the eluent indicated in each case.

(1S,2R,3S,4R,5R)-N-[N'-(Ethylene-2-(N''-(C-(2-butyloxy-[1,3]dioxolan-4-yl)-methylene)thioureido))thioureido]-2,3,4-trihydroxy-6-oxa-nor-tropane (88). Column chromatography, eluent 100:10:1 CH₂Cl₂-MeOH-H₂O. Yield: 64 mg (58%). *R_f* 0.13 (100:10:1 CH₂Cl₂-MeOH-H₂O). [α]_D + 30.4 (*c* 1.0, 10:1 MeCN-MeOH).

¹H NMR (500 MHz, acetone-*d*₆, 313 K) δ 7.83 (b, 1 H, NH), 7.35 (b, 1 H, NH), 7.17 (b, 1 H, NH), 5.86 (s, 1 H, H-1), 5.82, 5.79 (s, 1 H total, H-12, 4.95-4.83 (m, 1 H, H-5), 4.55-4.25 (m, 2 H, HN-CH₂-CH-CH₂-O, OH), 4.25-3.92 (m, 4 H, HN-CH₂-CH-CH_a-O, H-6a, OH), 3.92-3.65 (m, 9 H, HN-CH₂-CH-CH_b-O, HN-CH₂-CH-CH_b-O, H-6b, H-4, NH-CH₂-CH₂-NH, OH), 3.65-3.45 (m, 4 H, H-2, H-3, O-CH₂-CH₂), 1.63-1.48 (m, 2 H, O-CH₂-CH₂), 1.45-1.25 (m, 2 H, CH₂), 0.98-0.85 (m, 3 H, CH₃).

¹³C NMR (125.7 MHz, acetone-*d*₆, 313 K) δ 180.7 (CS), 116.7, 116.3 (O-CH(O)-O), 90.0 (C-1), 77.8 (C-3), 76.1, 75.8, 75.3 (HN-CH₂-CH-CH₂-O, C-2), 72.4 (C-4), 66.8, 66.7 (HN-CH₂-CH-CH₂-O, C-6), 64.9, 64.4 (O-CH₂-CH₂), 59.7 (C-5), 47.9-46.6 (HN-CH₂-CH-CH₂-O), 43.8 (NH-CH₂-CH₂-NH), 32.6 (O-CH₂-CH₂), 20.1 (CH₂-CH₃), 14.2 (CH₂-CH₃).

ESIMS *m/z* 479.0 ([M - H]⁻). Anal. Calcd for C₁₈H₃₂N₄O₇S₂: C, 44.98; H, 6.71; N, 11.66; S, 13.34. Found: C, 45.11; H, 6.68; N, 11.60; S, 13.09.

(1S,2R,3S,4R,5R)-N-[N'-(Ethylene-2-(N''-(C-(2-octyloxy-[1,3]dioxolan-4-yl)-methylene)thioureido))thioureido]-2,3,4-trihydroxy-6-oxa-nor-tropane (89). Column chromatography, eluent 100:10:1 CH₂Cl₂-MeOH-H₂O. Yield: 71 mg (59%). *R_f* 0.23 (100:10:1 CH₂Cl₂-MeOH-H₂O). [α]_D + 24.4 (*c* 1.0, acetone).

¹H NMR (500 MHz, MeOD, 323 K) δ 5.86 (s, 1 H, H-1), 5.77, 5.72 (s, 1 H total, H-12), 4.95-4.83 (m, 1 H, H-5), 4.60-4.30 (m, 1 H, HN-CH₂-CH-CH₂-O, partially covered by water peak), 4.25-4.00 (m, 2 H, HN-CH₂-CH-CH_a-O, H-6a), 3.85-3.45 (m, 13 H, HN-CH₂-CH-CH_b-O, HN-CH₂-CH-CH_b-O, H-6b, H-2, H-3, H-4, NH-CH₂-CH₂-NH,

O-CH₂-CH₂), 1.60-1.50 (m, 2 H, O-CH₂-CH₂), 1.45-1.22 (m, 10 H, CH₂), 0.95-0.85 (m, 3 H, CH₃).

¹³C NMR (125.7 MHz, MeOD, 323 K) δ 180.8, 176.2 (CS), 117.6, 117.2 (O-CH(O)-O), 90.2 (C-1), 79.4, 79.1, 78.9 (HN-CH₂-CH-CH₂-O), 77.4 (C-3), 75.8 (C-2), 72.4 (C-4), 67.2, 67.1, 67.0 (HN-CH₂-CH-CH₂-O, C-6), 65.0, 63.1 (O-CH₂-CH₂), 60.1 (C-5), 46.7, 44.1 (NH-CH₂-CH₂-NH), 33.6, 32.9, 30.4, 30.3, 26.9, 23.6, 22.0 (CH₂), 14.3 (CH₃).

ESIMS *m/z* 559 ([M + Na]⁺).

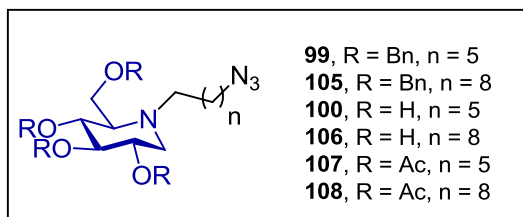
(1*S*,2*R*,3*S*,4*R*,5*R*)-*N*-[*N'*-(Ethylene-(*N''*-2-(*C*-(2-dodecyloxy-[1,3]dioxolan-4-yl)-methylene)thioureido))thioureido]-2,3,4-trihydroxy-6-oxa-nor-tropane (90).

Column chromatography, eluent 100:10:1 CH₂Cl₂-MeOH-H₂O. Yield: 57 mg (53%). *R_f* 0.20 (100:10:1 CH₂Cl₂-MeOH-H₂O). [α]_D + 27.0 (*c* 1.0, 5:1 MeCN-MeOH).

¹H NMR (500 MHz, acetone-*d*₆, 313 K) δ 7.82 (b, 1 H, NH), 7.35 (b, 1 H, NH), 7.17 (b, 1 H, NH), 5.86 (s, 1 H, H-1), 5.82, 5.79 (s, 1 H total, H-12), 4.95-4.83 (m, 1 H, H-5), 4.55-4.25 (m, 2 H, HN-CH₂-CH-CH₂-O, OH), 4.25-3.93 (m, 4 H, HN-CH₂-CH-CH_a-O, H-6a, OH), 3.93-3.65 (m, 9 H, HN-CH₂-CH-CH_b-O, HN-CH₂-CH-CH_b-O, H-6b, H-4, NH-CH₂-CH₂-NH, OH), 3.65-3.45 (m, 4 H, H-2, H-3, O-CH₂-CH₂), 1.63-1.50 (m, 2 H, O-CH₂-CH₂), 1.45-1.22 (m, 18 H, CH₂), 0.90-0.80 (m, 3 H, CH₃).

¹³C NMR (75.5 MHz, acetone-*d*₆, 313 K) δ 185.0, 180.3 (CS), 116.5, 116.2 (O-CH(O)-O), 89.9 (C-1), 77.5 (C-3), 76.0, 75.7, 75.1 (HN-CH₂-CH-CH₂-O, C-2), 72.2 (C-4), 66.7 (HN-CH₂-CH-CH₂-O, C-6), 65.1, 64.7 (O-CH₂-CH₂), 59.6 (C-5), 47.8-47.1 (HN-CH₂-CH-CH₂-O), 43.7 (NH-CH₂-CH₂-NH), 32.7, 26.9, 23.4 (CH₂, partially covered by acetone signal), 14.4 (CH₃).

ESIMS *m/z* 591.1 ([M - H]⁻). Anal. Calcd for C₂₆H₄₈N₄O₇S₂: C, 52.68; H, 8.16; N, 9.45; S, 10.82. Found: C, 52.87; H, 8.26; N, 9.33; S, 10.62.

Preparation of *N*-azidoalkyl DNJ derivatives.***N*-(6-azidoethyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl-1,5-dideoxy-1,5-imino-D-glucitol (99).**

A mixture of **201** (120 mg, 0.23 mmol), 1-azido-6-bromohexane (236 mg, 1.15 mmol), Et₃N (0.3 mL, 2.29 mmol) and DMAP (4 mg, 0.03 mmol) in DMF (4.5 mL) was stirred at 120°C for 4 days. The mixture was cooled at rt and H₂O (9 mL) was added. The aqueous layer was extracted with Et₂O (3 x 25 mL). The combined organic layers were dried (Na₂SO₄), filtered and concentrated. The residue was purified by column chromatography using 5:1 EtOAc-petroleum ether as eluent. Yield: 57 mg (38%). [α]_D – 5.0 (*c* 1.0, CHCl₃). IR 2093 (N₃) cm^{–1}.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.00-1.17 (m, 2 H), 1.17-1.41 (m, 4 H), 1.49 (m, 2 H, *J* = 7 Hz, H-11), 2.15 (t, 1 H, *J* = 11 Hz, H-1A), 2.25 (br d, 1 H, *J* = 9 Hz, H-5), 2.42-2.55 (m, 1 H, H-7A), 2.55-2.69 (m, 1 H, H-7B), 3.02 (dd, 1 H, *J* = 11 and 5 Hz, H-1B), 3.16 (t, 2 H, *J* = 7 Hz, H-12), 3.40 (t, 1 H, *J* = 9 Hz, H-3), 3.45-3.54 (m, 2 H), 3.54-3.65 (m, 2 H), 4.37-4.44 (m, 3 H, CH₂Ph), 4.58 (d, 1 H, *J* = 12 Hz, CH₂Ph), 4.64 (d, 1 H, *J* = 12 Hz, CH₂Ph), 4.75 (d, 1 H, *J* = 11 Hz, CH₂Ph), 4.82 (d, 1 H, *J* = 11 Hz, CH₂Ph), 4.90 (d, 1 H, *J* = 11 Hz, CH₂Ph), 7.03-7.12 (m, 2 H, ArH), 7.12-7.37 (m, 18 H, ArH).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 23.8, 26.7, 27.1, 28.9, 51.4, 52.3, 54.6, 64.0, 65.7, 72.8, 73.5, 75.3, 75.4, 78.7, 78.7, 87.4, 127.5, 127.6, 127.7, 127.9, 128.4, 128.4, 128.5, 137.9, 138.7, 139.1.

HRMS (ESI) *m/z* 649.378 ([M+H]⁺, calcd. for C₄₀H₄₉N₄O₄ 649.375).

***N*-(9-Azidononyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl-1,5-dideoxy-1,5-imino-D-glucitol**

(105). A suspension of **201** (500 mg, 0.95 mmol), 1-azido-9-bromononane (308 mg, 1.24

mmol), and K_2CO_3 (172 mg, 1.24 mmol) in CH_3CN (10 mL) was heated under MW at 150 °C for 2 h. An additional portion of 1-azido-9-bromononane (118 mg, 0.48 mmol) was added and the suspension was heated under MW at 150 °C for 1 h. The resulting suspension was filtered, the solid was extracted with CH_2Cl_2 (2 x 15 mL), the filtrate was concentrated to dryness and purified by flash chromatography (1:9 EtOAc-petroleum ether). Yield: 462 mg (65%). R_f 0.74 (1:2 EtOAc- petroleum ether). $[\alpha]_D - 3.8$ (c 1.0, $CHCl_3$). IR 2093 (N_3) cm^{-1} .

1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 7.39-7.26 (m, 18 H, ArH), 7.18-7.15 (m, 2 H, ArH), 4.99 (d, 1 H, $J = 11.1$ Hz, CH_2Ph), 4.91 (d, 1 H, $J = 10.8$ Hz, CH_2Ph), 4.85 (d, 1 H, $J = 11.1$ Hz, CH_2Ph), 4.73 (d, 1 H, $J = 11.7$ Hz, CH_2Ph), 4.68 (d, 1 H, $J = 11.7$ Hz, CH_2Ph), 4.55-4.47 (m, 2 H, CH_2Ph), 4.45 (d, 1 H, $J = 10.8$ Hz, CH_2Ph), 3.75-3.68 (m, 1 H, H-2), 3.70-3.60 (m, 1 H, H-6a), 3.66-3.59 (m, 1 H, H-4), 3.57 (dd, 1 H, $J = 11.5$, 2.1 Hz, H-6b), 3.49 (t, 1 H, $J = 9.0$ Hz, H-3), 3.29 (t, 2 H, $J = 6.9$ Hz, H-15), 3.12 (dd, 1 H, $J = 11.1$, 4.8 Hz, H-1a), 2.76-2.55 (m, 2 H, H-7), 2.33(br d, 1 H, $J = 9.6$ Hz, H-5), 2.26 (t, 1 H, $J = 10.8$ Hz, H-1b), 1.63 (m, 2 H, $J = 6.9$ Hz, H-14), 1.44-1.15 (m, 12 H, H-8 to H-13).

^{13}C NMR (75.5 MHz, $CDCl_3$) δ 139.1, 138.6, 137.9, 128.5, 128.4, 128.3, 127.9, 127.8, 127.6, 127.5, 127.4, 87.4, 78.7, 78.6, 75.3, 75.2, 73.5, 72.8, 65.4, 63.7, 54.5, 52.4, 51.5, 29.5, 29.4, 29.1, 28.9, 27.5, 26.7, 23.6.

HRMS (ESI) m/z 691.422 ($[M + H]^+$, calcd for $C_{43}H_{55}N_4O_4$ 691.419).

***N*-(6-Azidohexyl)-1,5-dideoxy-1,5-imino-D-glucitol (100).** To a solution of **99** (154 mg, 0.24 mmol) in CH_2Cl_2 (3 mL), 1 M BCl_3 solution in CH_2Cl_2 (0.62 mL, 0.62 mmol) was added at -60 °C and the mixture was allowed to warm to 0 °C over 3 h. A MeOH-H₂O mixture (20:1, 3 mL) was added, and the resulting mixture was concentrated under vacuum, those steps were repeated twice. MeOH was added and the mixture treated with an anionic resin (Amberlite IRA-440C). The filtrate was concentrated, and purified

by column chromatography 9:1 CH₂Cl₂-MeOH as eluent. Yield: 53 mg (77%). $[\alpha]_D - 13.0$ (*c* 1.0, MeOH). IR 3356 (OH), 2095 (N₃) cm⁻¹.

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 1.29-1.52 (m, 4 H), 1.52-1.69 (m, 4 H), 2.30-2.45 (m, 2 H, H-1A, H-5), 2.66-2.81 (m, 1 H, H-7A), 2.87-3.03 (m, 1 H, H-7B), 3.12 (dd, 1 H, *J* = 11 and 5 Hz, H-1B), 3.20 (t, 1 H, *J* = 9 Hz, H-3), 3.28-3.35 (m, 2 H, H-12), 3.42 (t, 1 H, *J* = 9 Hz, H-4), 3.54 (td, 1 H, *J* = 9 and 5 Hz, H-2), 3.90 (d, 2 H, *J* = 1.5 Hz, H-6).

¹³C NMR (75 MHz, CD₃OD) δ 25.0, 27.6, 27.9, 29.8, 52.4, 53.7, 57.1, 58.6, 67.4, 70.2, 71.4, 80.1.

HRMS (ESI) *m/z* 289.184 ([M+H]⁺, calcd. for C₁₂H₂₅N₄O₄ 289.187).

***N*-(9-Azidononyl)-1,5-dideoxy-1,5-imino-D-glucitol (106).** To a solution of **105** (426 mg, 0.62 mmol) in CH₂Cl₂ (8 mL), a freshly prepared solution of 1 M BCl₃ in CH₂Cl₂ (5.0 mL, 5.0 mmol) was added at -60 °C under Ar atmosphere. The resulting mixture was allowed to warm to 0 °C over 3 h. A MeOH-H₂O mixture (20:1, 21 mL) was added and the resulting mixture was concentrated under vacuum, these steps were repeated twice. MeOH (20 mL) was added and the mixture was neutralized with anionic resin (Amberlite IRA-440C). The filtrate was concentrated, and purified by flash chromatography (9:1 → 8:2 CH₂Cl₂-MeOH) as eluent. Yield: 161 mg (79%). *R_f* 0.54 (8:2 CH₂Cl₂-MeOH). $[\alpha]_D - 13.4$ (*c* 1.0, MeOH). IR 3338 (OH), 2094 (N₃) cm⁻¹.

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 3.87 (d, 2 H, *J* = 2.7 Hz, H-6), 3.50 (td, 1 H *J* = 9.3, 4.8 Hz, H-2), 3.38 (t, 1 H, *J* = 9.3 Hz, H-4), 3.28 (t, 2 H, *J* = 6.9 Hz, H-15), 3.16 (t, 1 H, *J* = 9.0 Hz, H-3), 3.04 (dd, 1 H, *J* = 11.1, 4.8 Hz, H-1a), 2.91-2.81 (m, 1 H, H-7a), 2.70-2.60 (m, 1 H, H-7b), 2.27 (t, 1 H, *J* = 11.1 Hz, H-1b), 2.22 (b, 1 H, *J* = 7.5 Hz, H-5), 1.63-1.45 (m, 4 H, H-8 and H-14), 1.45-1.22 (m, 10 H, H-9 to H-13).

¹³C NMR (75.5 MHz, CD₃OD) δ 80.4, 71.7, 70.5, 67.5, 59.0, 57.4, 53.9, 52.6, 30.7, 30.6, 30.3, 30.0, 28.6, 27.9, 25.27.

HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₁₅H₃₁N₄O₄ 331.234 ([M + H]⁺, found 331.234).

***N*-(6-Azidoethyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1,5-dideoxy-1,5-imino-D-glucitol**

(107). To a solution of **100** (200 mg, 0.694 mmol) in py-Ac₂O (1:1 18 mL) DMAP (13 mg, 0.104 mmol) was added. The solution was stirred for 24 h, H₂O (9 mL) was slowly added at 0 °C for quenching. The aqueous phase was extracted with CH₂Cl₂ (2 x 15 mL). The combined organic layers were washed with an aqueous solution of 2 M HCl (2 x 10 mL) and a saturated aqueous NaHCO₃ solution (15 mL), dried (Na₂SO₄), filtered and concentrated. The resulting residue was purified by flash chromatography (1:20 → 1:2 EtOAc-petroleum ether) as eluent. Yield: 289 mg (91%). *R_f* 0.30 (1:3 EtOAc-petroleum ether). $[\alpha]_D + 9.2$ (*c* 1.0, CHCl₃). IR 2095 (OH), 1740 (N₃) cm⁻¹.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃, 300 K) δ 5.09-4.97 (m, 2 H, H-3 and H-4), 4.97-4.88 (m, 1 H, H-2), 4.20-4.05 (m, 2 H, H-6), 3.23 (t, 2 H, *J* = 6.8 Hz, H-12), 4.27 (dd, 1 H, *J* = 11.4 and 5.0 Hz, H-1a), 2.78-2.65 (m, 1 H, H-7a), 2.60 (dt, 1 H, *J* = 8.9 and 2.5 Hz, H-5), 2.57-2.45 (m, 1 H, H-7b), 2.28 (t, 1 H, *J* = 10.8 Hz, H-1b), 2.04 (s, 3 H, C=OCH₃), 1.99 (s, 6 H, C=OCH₃), 1.98 (s, 3 H, C=OCH₃), 1.63-1.49 (m, 2 H, H-11) 1.49-1.13 (m, 6 H, H-8, H-9 and H-10).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃, 300 K) δ 171.0, 170.4, 170.1, 169.8, 74.8, 69.6, 69.5, 61.7, 59.6, 53.0, 51.7, 51.4, 28.9, 26.8, 26.7, 24.9, 21.0, 20.9, 20.83, 20.77.

HRMS (ESI) *m/z* 457.228 [M + H]⁺, calcd. for C₂₀H₃₃N₄O₈ 457.229.

***N*-(9-Azidononyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1,5-dideoxy-1,5-**

imino-D-glucitol (108). To a solution of **106** (183 mg, 0.553 mmol) in Py-Ac₂O (1:1, 14 mL) DMAP (10 mg, 0.082 mmol) was added. The solution was stirred for 24 h, then H₂O (9 mL) was added slowly at 0 °C to quench the reaction. The aqueous phase was extracted with CH₂Cl₂ (2 x 15 mL) and the combined organic layers were washed with aqueous 2 M HCl (2 x 10 mL) and saturated aqueous NaHCO₃ (15 mL), dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated. The resulting residue was purified by flash chromatography (1:9 → 1:4 EtOAc-petroleum ether) as eluent. Yield: 229 mg (83%). *R_f*

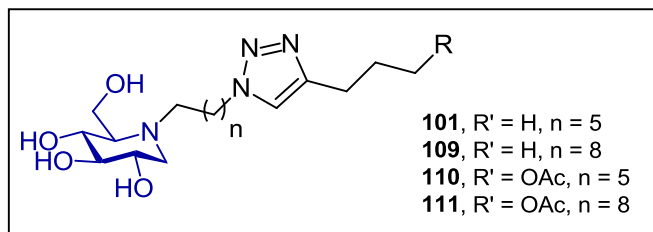
0.30 (1:3 EtOAc-petroleum ether). $[\alpha]_D + 8.0$ (*c* 1.0, CHCl_3). IR 2096 (OH), 1744 (N_3) cm^{-1} .

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , 300 K) δ 5.11-4.98 (m, 2 H, H-3 and H-4), 4.98-4.89 (m, 1 H, H-2), 4.22-4.06 (m, 2 H, H-6), 3.24 (t, 2 H, $J = 6.8$ Hz, H-12), 3.17 (dd, 1 H, $J = 11.2$, 4.8 Hz, H-1a), 2.79-2.47 (m, 3 H, H-7, H-5), 2.31 (t, 1 H, $J = 10.6$ Hz, H-1b), 2.05 (s, 3 H, $\text{C}=\text{OCH}_3$), 2.00 (s, 6 H, $\text{C}=\text{OCH}_3$), 1.99 (s, 3 H, $\text{C}=\text{OCH}_3$), 1.64-1.45 (m, 2 H, H-14) 1.45-1.09 (m, 12 H, H-8, H-9, H-10, H-11, H-12 and H-13).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3 , 300 K) δ 171.0, 170.5, 170.1, 169.8, 74.8, 69.6, 69.5, 61.5, 59.6, 53.0, 51.9, 51.5, 29.5, 29.4, 29.1, 28.9, 27.2, 26.8, 24.7, 24.9, 21.0, 20.9, 20.84, 20.78.

HRMS (ESI) m/z calcd. for $\text{C}_{23}\text{H}_{39}\text{N}_4\text{O}_8$ 499.276 $[\text{M} + \text{H}]^+$; found 499.273.

Preparation of 1,2,3-triazole derivatives of DNJ by CuAAC.



N-(6-(4-Propyl-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl))-1,5-dideoxy-1,5-imino-D-glucitol (**101**).

A mixture of **100** (16 mg, 0.06 mmol), 1-pentyne (0.03 mL, 0.28 mmol), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (1 mg, 0.006 mmol) and sodium ascorbate (3 mg, 0.02 mmol) in $\text{DMF-H}_2\text{O}$ (1:1, 2 mL) was stirred at rt. After 19 h, an additional portion of 1-pentyne (0.03 mL, 0.28 mmol) was added and the mixture was heated at 50 °C for 2 h. The mixture was then filtered through a pad of celite and concentrated. The residue was purified by column chromatography using 9:1 CH_2Cl_2 -MeOH as eluent. Yield: 12 mg (61%). $[\alpha]_D - 10.0$ (*c* 0.82, MeOH). IR (neat) 3317 cm^{-1} .

^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ 0.96 (t, 3 H, $J = 7$ Hz, H-17), 1.24-1.42 (m, 4 H, H-9, H-10), 1.45-1.59 (m, 2 H, H-8), 1.69 (m, 2 H, $J = 7$ Hz, H-16), 1.91 (br t, 2 H, $J = 7$ Hz, H-11), 2.25-2.37 (m, 2 H, H-1A, H-5), 2.59-2.75 (m, 3 H, H-7A, H-15), 2.82-2.97 (m, 1 H, H-7B), 3.07 (dd, 1 H, $J = 11$ and 5 Hz, H-1B), 3.17 (t, 1 H, $J = 9$ Hz, H-3), 3.39 (t, 1 H, $J = 9$ Hz, H-4), 3.50 (td, 1 H, $J = 9$ and 5 Hz, H-2), 3.87 (d, 2 H, $J = 3$ Hz, H-6), 4.37 (t, 2 H, $J = 7$ Hz, H-12), 7.73 (s, 1 H, H-13).

^{13}C NMR (75 MHz, CD_3OD) δ 14.0, 23.8, 25.0, 27.3, 27.7, 28.3, 31.2, 51.1, 53.7, 57.2, 58.8, 67.5, 70.2, 71.5, 80.2, 123.1, 149.1.

HRMS (ESI) m/z 357.250 ($[\text{M}+\text{H}]^+$, calcd. for $\text{C}_{17}\text{H}_{33}\text{N}_4\text{O}_4$ 357.246).

***N*-(9-(4-Propyl-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)nonyl)-1,5-dideoxy-**

1,5-imino-D-glucitol (109). To a solution of **100** (50 mg, 0.15 mmol) and 1-pentyne (52 mg, 0.76 mmol) in THF (2 mL), a solution of $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (3.8 mg, 0.015 mmol) and sodium ascorbate (6.0 mg, 0.030 mmol) in H_2O (2 mL), and 2,6-lutidine (5.3 mL, 0.045 mmol), were added. The resulting solution was stirred at rt for 17 h, then the mixture was then filtered through a pad of celite, concentrated, and the residue was purified by flash chromatography (9:1 \rightarrow 4:1 CH_2Cl_2 -MeOH) as eluent. Yield: 32 mg (54%). R_f 0.38 (4:1 CH_2Cl_2 -MeOH). $[\alpha]_D - 12.8$ (c 1.0, MeOH). IR 3331 cm^{-1} .

^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ 7.73 (s, 1 H, H-16), 4.35 (t, 2 H, $J = 7.2$ Hz, H-15), 3.86 (d, 2 H, $J = 2.4$ Hz, H-6), 3.49 (td, 1 H, $J = 9.0, 3.0$ Hz, H-2), 3.37 (t, 1 H, $J = 9.0$ Hz, H-4), 3.15 (t, 1 H, $J = 9.0$ Hz, H-3), 3.03 (dd, 1 H, $J = 10.0, 3.0$ Hz, H-1a), 2.90-2.75 (m, 1 H, H-7a), 2.66 (t, 2 H, $J = 7.5$ Hz, H-18), 2.66-2.57 (m, 1 H, H-7b), 2.35-2.15 (m, 2 H, H-1b and H-5), 1.88 (m, 2 H, $J = 7.2$ Hz, H-14), 1.69 (m, 2 H, $J = 7.5$ Hz, H-19), 1.56-1.41 (m, 2 H, H-8), 1.40-1.21 (m, 10 H, H-9 to H-13), 0.96 (t, 3 H, $J = 7.5$ Hz, H-20).

^{13}C NMR (75.5 MHz, CD_3OD) δ 149.2, 123.3, 80.5, 71.9, 70.6, 67.5, 59.2, 57.6, 53.9, 51.3, 31.4, 30.6, 30.1, 28.6, 28.4, 27.6, 25.3, 24.0, 14.1.

HRMS (ESI) m/z calcd. for $\text{C}_{20}\text{H}_{39}\text{N}_4\text{O}_4$ 399.297 $[\text{M} + \text{H}]^+$; found 399.298.

***N*-(6-(4-(3-Acetoxypropyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)hexyl)-1,5-dideoxy-1,5-imino-D-glucitol (110).** To a solution of **100** (50 mg, 0.17 mmol) and 4-pentynyl acetate (44 mg, 0.35 mmol) in THF (2 mL), a solution of CuSO₄·5H₂O (4.3 mg, 0.017 mmol) and sodium ascorbate (6.8 mg, 0.034 mmol) in H₂O (2 mL), and 2,6-lutidine (6.0 mL, 0.052 mmol) were added. The resulting solution was stirred at rt for 18 h. The mixture was then filtered through a pad of celite, concentrated and residue purified by flash chromatography (9:1 → 4:1 CH₂Cl₂-MeOH). Yield: 47 mg (67%). *R_f* 0.26 (4:1 CH₂Cl₂-MeOH). [α]_D – 10.1 (*c* 1.0, MeOH). IR 3340, 1734 cm^{–1}.

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 7.78 (s, 1 H, H-13), 4.37 (t, 2 H, *J* = 6.9 Hz, H-12), 4.09 (t, 2 H, *J* = 6.9 Hz, H-17), 3.86-3.76 (m, 2 H, H-6), 3.53-3.41 (m, 1 H, H-2), 3.36 (t, 1 H, *J* = 9.0 Hz, H-4), 3.14 (t, 1 H, *J* = 9.0 Hz, H-3), 3.05-2.95 (m, 1 H, H-1a), 2.90-2.75 (m, 1 H, H-7a), 2.78 (t, 2 H, *J* = 6.9 Hz, H-15), 2.65-2.51 (m, 1 H, H-7b), 2.26-2.05 (m, 2 H, H-1b and H-5), 2.03 (s, 3 H, H-19), 2.00 (m, 2 H, *J* = 6.9 Hz, H-16), 1.95-1.83 (m, 2 H, H-11), 1.59-1.41 (m, 2 H, H-8), 1.41-1.25 (m, 4 H, H-9 and H-10).

¹³C NMR (75.5 MHz, CD₃OD) δ 173.0, 148.2, 123.6, 80.5, 71.9, 70.6, 67.6, 64.8, 59.3, 57.6, 53.8, 51.3, 31.3, 29.6, 28.0, 27.5, 25.2, 22.9, 20.9.

HRMS (ESI) *m/z* 415.261 [M + H]⁺, calcd. for C₁₉H₃₅N₄O₆ 415.255.

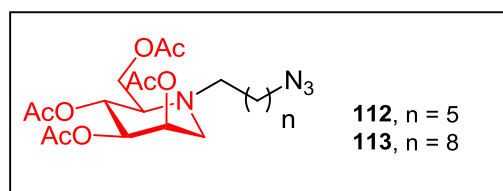
***N*-(9-(4-(3-Acetoxypropyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)nonyl)-1,5-dideoxy-1,5-imino-D-glucitol (111).** To a solution of **106** (27 mg, 0.083 mmol) and 4-pentynyl acetate (21 mg, 0.17 mmol) in THF (1 mL), was added a solution of CuSO₄·5H₂O (2.1 mg, 0.008 mmol) and sodium ascorbate (3.3 mg, 0.017 mmol) in H₂O (1 mL), and then, 2,6-lutidine (2.9 mL, 0.025 mmol). The resulting solution was stirred at rt for 18 h. The mixture was then filtered through a pad of celite, concentrated and purified by flash chromatography (9:1 → 4:1 CH₂Cl₂-MeOH) as eluent. Yield: 23 mg (61%). *R_f* 0.44 (4:1 CH₂Cl₂-MeOH). [α]_D – 9.7 (*c* 1.0, MeOH). IR 3353, 1738 cm^{–1}.

^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ 7.77 (s, 1 H, H-16), 4.36 (t, 2 H, $J = 7.2$ Hz, H-15), 4.09 (t, 2 H, $J = 7.2$ Hz, H-20), 3.86 (d, 2 H, $J = 2.7$ Hz, H-6), 3.48 (td, 1 H, $J = 9.0$ and 3.0 Hz, H-2), 3.36 (t, 1 H, $J = 9.0$ Hz, H-4), 3.14 (t, 1 H, $J = 9.0$ Hz, H-3), 3.01 (dd, 1 H, $J = 10.5$ and 3.0 Hz, H-1a), 2.90-2.75 (m, 1 H, H-7a), 2.78 (t, 2 H, $J = 7.2$ Hz, H-18), 2.65-2.55 (m, 1 H, H-7b), 2.25-2.15 (m, 2 H, H-1b and H-5), 2.03 (s, 3 H, H-22), 2.00 (m, 2 H, $J = 7.2$ Hz, H-19), 1.95-1.82 (m, 2 H, H-14), 1.55-1.43 (m, 2 H, H-8), 1.41-1.21 (m, 10 H, H-9 to H-13).

^{13}C NMR (75.5 MHz, CD_3OD) δ 173.0, 148.2, 123.5, 80.6, 72.0, 70.7, 67.5, 64.8, 59.3, 57.7, 53.9, 51.4, 31.4, 30.6 (CH_2), 30.1, 29.6, 28.6, 27.6, 25.3, 22.9, 20.9.

HRMS (ESI) m/z 457.306 $[\text{M} + \text{H}]^+$, calcd. for $\text{C}_{22}\text{H}_{41}\text{N}_4\text{O}_6$ 457.302.

Preparation of *N*-azidoalkyl DMJ derivatives.



N-(6-Azidohexyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1,5-dideoxy-1,5-imino-*D*-mannitol

(112). To a solution of 1-deoxymanojirimicin hydrochloride (21.8 mg, 0.109 mmol) in DMF (0.8 mL) K_2CO_3 (55 mg, 0.401 mmol) and 1-azido-6-bromohexane (49 mg, 0.200 mmol) were added. The mixture was heated at 90 °C for 4 h. The solvent was then removed by evaporation and the crude mixture was directly used in the next step without purification. This crude product was dissolved in pyridine (1.3 mL) and dimethylaminopyridine (DMAP) (2.4 mg, 20 μmol .) and Ac_2O (1.3 mL) were added. The mixture was stirred at rt for 3 h. The solvent was then removed by evaporation and the residue was purified by column chromatography using 1:1 EtOAc-petroleum ether as

eluent. Yield: 38.9 mg (78% over two steps). $[\alpha]_{\text{D}} - 34.0$ (*c* 1.0, CHCl_3). IR 2095, 1737 cm^{-1} .

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 1.23-1.46 (m, 6 H, H-8, H-9, H-10), 1.57 (qt, 2 H, $J = 7.1$ Hz, H-11), 1.99 (s, 3 H, $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 2.03 (s, 3 H, $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 2.06 (s, 3 H, $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 2.09 (s, 3 H, $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 2.53-2.66 (m, 2 H, H-1a and H-7a), 2.66-2.78 (m, 2 H, H-5 and H-7b), 3.03 (dd, 1 H, $J = 13.1$ and 4.9 Hz, H-1b), 3.23 (t, 2 H, $J = 6.8$ Hz, H-12), 4.14-4.28 (m, 2 H, H-6), 4.95 (dd, 1 H, $J = 8.5$ and 3.5 Hz, H-3), 5.16-5.30 (m, 2 H, H-4 and H-2).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 20.8, 20.9, 21.0, 21.2 (4 $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 25.2, 26.7, 26.8 (C-8, C-9 and C-10), 28.9 (C-11), 50.8 (C-1), 51.4 (C-12), 52.7 (C-7), 60.1 (C-6), 61.3 (C-5), 67.2 (C-2), 68.1 (C-4), 71.6 (C-3), 169.8, 170.1, 170.6, 171.0 (4 $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$).

HRMS (ESI) m/z 457.230 $[\text{M} + \text{H}]^+$, calcd. for $\text{C}_{20}\text{H}_{33}\text{N}_4\text{O}_8$ 457.229.

***N*-(6-Azidononyl)-2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1,5-dideoxy-1,5-imino-D-mannitol**

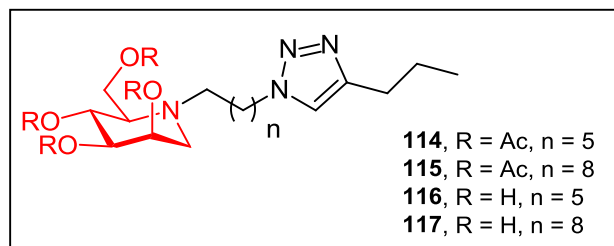
(113). To a solution of 1-deoxymanojirimicin hydrochloride (70 mg, 0.351 mmol) in DMF (2.6 mL) was added potassium carbonate (195 mg, 1.404 mmol, 4 eq.) and 1-azido-9-bromononane (175 mg, 0.702 mmol). The mixture was heated at 90 °C for 4 h. The solvent was then removed by evaporation and the crude mixture was directly used in the next step without purification. This crude product was dissolved in pyridine (4.2 mL) and DMAP (8.6 mg, 70.2 μmol) and Ac_2O (4.2 mL) were added. The mixture was stirred at rt for 3 h. The solvent was then removed by evaporation and the residue was purified by column chromatography using 1:1 EtOAc-petroleum ether as eluent. Yield: 150 mg (86% over two steps). $[\alpha]_{\text{D}} - 48.0$ (*c* 1.0, CHCl_3). IR 2095, 1740 cm^{-1} .

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 1.17-1.46 (m, 12 H, H-8, H-9, H-10, H-11, H-12, H-13), 1.53-1.65 (m, 2 H, H-14), 2.01 (s, 3 H, $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 2.05 (s, 3 H, $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 2.09 (s, 3 H, $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 2.12 (s, 3 H, $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 2.57-2.77 (m, 4 H, H-5, H-7a, H-7b, H-1a), 3.05 (dd, 1 H, $J = 13.1$ and 4.8 Hz, H-1b), 3.25 (t, 2 H, $J = 6.8$ Hz, H-15), 4.16-4.28 (m, 2 H, H-6), 4.96 (dd, 1 H, $J = 8.5$ and 3.5 Hz, H-3), 5.21-5.31 (m, 2 H, H-4 and H-2).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 20.8, 20.9, 21.1, 21.3 (4 $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 25.0, 26.8, 27.3, 29.0, 29.2, 29.5, 29.6 (C-8 to C-14), 50.8 (C-1), 51.6 (C-15), 52.9 (C-7), 60.1 (C-6), 61.3 (C-5), 67.4 (C-2), 68.1 (C-4), 71.8 (C-3), 169.8, 170.1, 170.6, 171.0 (4 $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$).

HRMS (ESI) m/z 521.256 $[\text{M} + \text{H}]^+$, calcd. for $\text{C}_{23}\text{H}_{38}\text{N}_4\text{NaO}_8$ 521.258.

Preparation of 1,2,3-triazole derivatives of DMJ by CuAAC.



***N*-(6-(4-Propyl-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl))-2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl-1,5-dideoxy-1,5-imino-*D*-mannitol (114).** Azide **112** (25.3 mg, 0.055 mmol) and 1-pentyne (18.8 mg, 0.277 mmol) were solubilized in THF (2 mL) and $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (1.4 mg, 0.006 mmol, 0.1 eq.) and sodium ascorbate (3.3 mg, 0.017 mmol) dissolved in H_2O (2 mL) were added. The mixture was stirred overnight and then the solvents were evaporated to dryness. The residue was purified by column chromatography using 1:1 EtOAc-petroleum ether + 1% NH_4OH as eluent. Yield: 20.8 mg (72%). $[\alpha]_{\text{D}} -37.5$ (c 1.0, CHCl_3). IR 1737 cm^{-1} .

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 0.96 (t, 3 H, $J = 7.3$ Hz, H-17), 1.24-1.48 (m, 6 H, H-8, H-9 and H-10), 1.68 (sextuplet, 2 H, $J = 7.5$ Hz, H-16), 1.80-1.95 (m, 2 H, H-11), 2.01 (s, 3 H, $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 2.04 (s, 3 H, $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 2.07 (s, 3 H, $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 2.09 (s, 3 H, $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 2.51-2.80 (m, 6 H, H-5, H-7, H-1a and H-15), 3.03 (dd, 1 H, $J = 13.2$ and 5.3 Hz, H-1b), 4.16-4.25 (m, 2 H, H-6), 4.29 (t, 2 H, $J = 7.2$ Hz, H-12), 4.96 (dd, 1 H, $J = 8.5$ and 3.5 Hz, H-3), 5.16-5.30 (m, 2 H, H-4 and H-2), 7.24 (s, 1 H, H-14).

^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 13.9 (C-17), 20.8, 20.95, 21.03, 21.2 ($\text{C}=\text{OCH}_3$), 22.8 (C-16), 25.2, 26.5, 26.7 (C-8, C-9 and C-10), 27.8 (C-15), 30.5 (C-11), 50.1 (C-12),

50.8 (C-1), 52.8 (C-7), 60.1 (C-6), 61.3 (C-5), 67.2 (C-2), 68.1 (C-4), 71.6 (C-3), 120.5 (C-14), 148.4 (C-13), 169.8, 170.1, 170.6, 171.0 (C=OCH₃).

HRMS (ESI) m/z 525.291 [M + H]⁺, calcd. for C₂₅H₄₁N₄O₈ 525.292.

***N*-(9-(4-Propyl-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl))-2,3,4,6-tetra-*O*-benzyl-1,5-dideoxy-1,5-imino-D-mannitol (115).** Compound **115** was obtained following general procedure for CuAAC reaction, starting from pent-1-yne (34 mg, 0.502 mmol) and iminosugar **113** (25 mg, 0.0502 mmol). Yield: 15 mg (52%). [α]_D – 44.0 (*c* 1.0, CHCl₃). IR 1742 cm^{–1}.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 0.96 (t, 3 H, *J* = 7.2 Hz, H-20), 1.18–1.45 (m, 12 H, H-8, H-9, H-10, H-11, H-12, H-13), 1.59–1.75 (m, 2 H, H-19), 1.81–1.92 (m, 2 H, H-14), 2.01 (s, 3 H, C(O)CH₃), 2.04 (s, 3 H, C(O)CH₃), 2.08 (s, 3 H, C(O)CH₃), 2.11 (s, 3 H, C(O)CH₃), 2.59–2.76 (m, 6 H, H-5, H-7, H-1a and H-18), 3.05 (dd, 1 H, *J* = 13.2 and 5.0 Hz, H-1b), 4.15–4.41 (m, 4 H, H-6, H-15), 4.96 (dd, 1 H, *J* = 8.7 and 3.6 Hz, H-3), 5.21–5.30 (m, 2 H, H-4 and H-2), 7.24 (s, 1 H, H-16).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 13.9 (C-20), 20.9, 21.0, 21.1, 21.3 (4 x C=OCH₃), 22.9, 24.9, 26.6, 27.2, 27.9, 29.1, 29.49, 29.53, 30.5 (C-8, C-9, C-10, C-11, C-12, C-13, C-14, C-18, C-19), 50.3 (C-15), 51.1 (C-1), 52.9 (C-7), 60.1 (C-6), 61.2 (C-5), 67.4 (C-2), 68.1 (C-4), 71.8 (C-3), 120.5 (C-14), 148.4 (C-16), 169.8, 170.1, 170.6, 171.0 (4 x C=OCH₃).

HRMS (ESI) m/z 566.334 [M + H]⁺, calcd. for C₂₈H₄₇N₄O₈ 566.331.

***N*-(6-(4-Propyl-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl))-1,5-dideoxy-1,5-imino-D-mannitol (116).** Compound **116** was prepared following Zemplen conditions, starting from **114** (20.8 mg, 0.040 mmol). Yield: 12 mg (85%). [α]_D – 39.5 (*c* 0.6, MeOH). IR 3367 cm^{–1}.

¹H NMR (300 MHz, CD₃OD) δ 0.96 (t, 3 H, *J* = 7.4 Hz, H-17), 1.25–1.37 (m, 4 H, H-9 and H-10), 1.40–1.54 (m, 2 H, H-8), 1.68 (sextuplet, 2 H, *J* = 7.4 Hz, H-16), 1.82–1.96 (m, 2 H, H-11), 2.10 (dt, 1 H, *J* = 9.0 and 2.5 Hz, H-5), 2.45 (dd, 1 H, *J* = 12.4 and 1.6 Hz, H-1a), 2.48–2.61 (m, 1 H, H-7a), 2.66 (t, 2 H, *J* = 7.4 Hz, H-15), 2.69–2.81 (m, 1

H, H-7b), 2.97 (dd, 1 H, $J = 12.2$ and 3.8 Hz, H-1b), 3.26-3.31 (m, 1 H, H-3), 3.65 (t, 1 H, $J = 9.1$ Hz, H-4), 3.78-3.83 (m, 1 H, H-2), 3.83-3.90 (m, 2 H, H-6), 4.36 (t, 2 H, $J = 7.0$ Hz, H-12), 7.72 (s, 1 H, H-13).

^{13}C NMR (75 MHz, CD_3OD) δ 14.0 (C-17), 23.8 (C-16), 25.3 (C-8), 27.4 and 27.9 (C-9 and C-10), 28.3 (C-15), 31.2 (C-11), 51.1 (C-12), 53.7 (C-7), 56.4 (C-1), 59.3 (C-6), 67.1 (C-5), 69.6 (C-2), 69.7 (C-4), 76.6 (C-3), 123.1 (C-13), 149.0 (C-14).

HRMS (ESI) m/z 379.231 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, calcd. for $\text{C}_{17}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{NaO}_4$ 379.232.

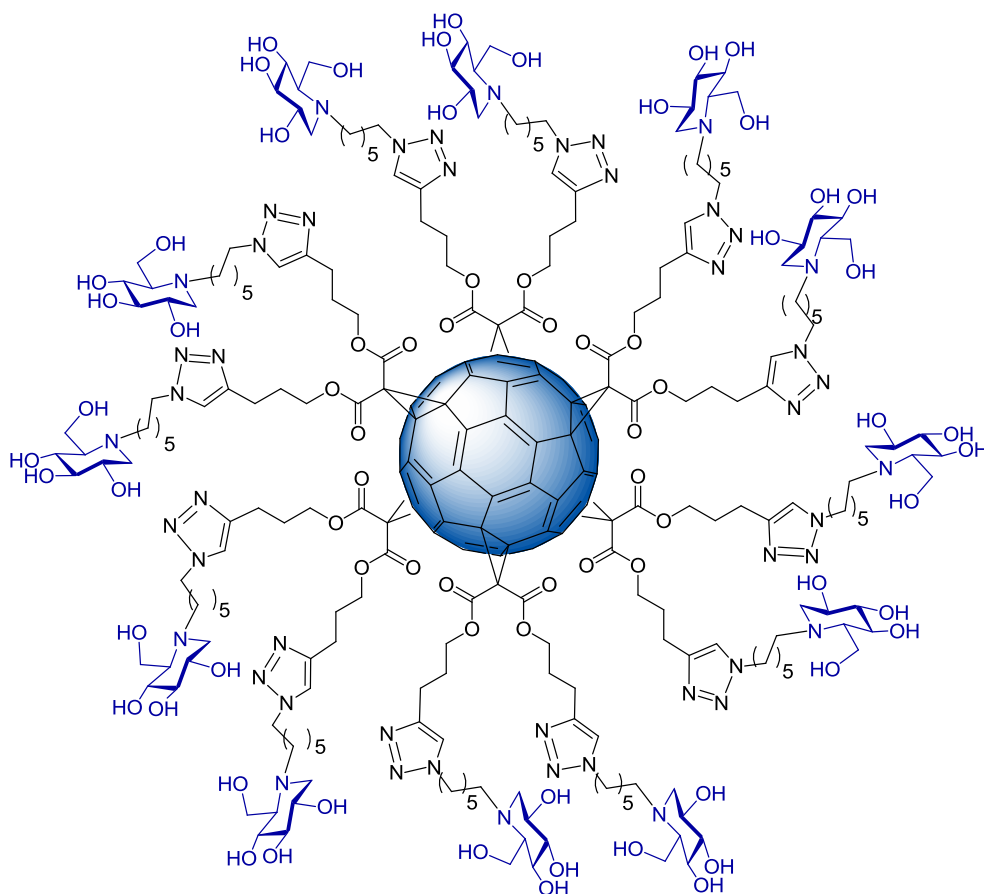
***N*-(9-(4-Propyl-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl))-1,5-dideoxy-1,5-imino-D-mannitol**

(117). Compound **117** was prepared following Zemplen conditions, starting from **115** (10 mg, 0.018 mmol). Yield: 7.4 mg (99%). $[\alpha]_{\text{D}} - 28.0$ (c 1.0, MeOH). IR 3368 cm^{-1} .

^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ 0.96 (t, 3H, $J = 7.3$ Hz, H-20), 1.25-1.37 (m, 10 H, H-9, H-10, H-11, H-12, H-13), 1.39-1.51 (m, 2 H, H-8), 1.68 (sextuplet, 2 H, $J = 7.4$ Hz, H-19), 1.81-1.93 (m, 2 H, H-14), 2.06-2.14 (m, 1 H, H-5), 2.41-2.83 (m, 5 H, H-1a, H-7a, H-7b, H-18), 2.96 (dd, 1 H, $J = 12.3$ and 3.7 Hz, H-1b), 3.26-3.31 (m, 1 H, H-3), 3.60-3.70 (m, 1 H, H-4), 3.78-3.83 (m, 1 H, H-2), 3.83-3.98 (m, 2 H, H-6), 4.35 (t, 2 H, $J = 7.0$ Hz, H-15), 7.72 (s, 1 H, H-16).

^{13}C NMR (75 MHz, CD_3OD) δ 14.0 (C-20), 23.8, 25.3, 27.4, 28.3, 28.5, 30.0, 30.5 (2C), 31.3 (C-8, C-9, C-10, C-11, C-12, C-13, C-14, C-18, C-19), 51.2 (C-15), 53.9 (C-7), 56.5 (C-1), 59.2 (C-6), 67.0 (C-5), 69.6 (C-2), 69.7 (C-4), 76.6 (C-3), 123.1 (C-16), 149.0 (C-17).

HRMS (ESI) m/z 437.308 $[\text{M} + \text{Na}]^+$, calcd. for $\text{C}_{21}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{NaO}_4$ 437.311.

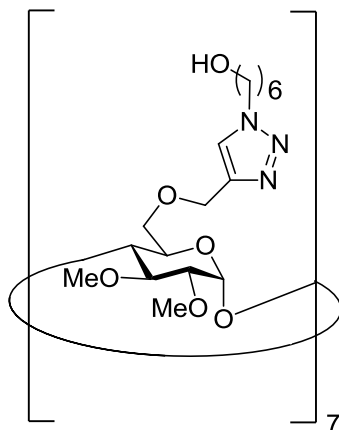
Preparation of multivalent DNJ- $[C_{60}]$ fullerene by CuAAC (102).

To a mixture of **197** (40 mg, 0.013 mmol), **100** (52 mg, 0.17 mmol), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.2 mg, 0.001 mmol) and sodium ascorbate (0.8 mg, 0.004 mmol) in CH_2Cl_2 - H_2O -DMSO (1:1:1, 1.5 mL), a solution of TBAF in THF (1 M, 0.19 mL, 0.19 mmol) was added. The resulting mixture was vigorously stirred at rt. After 24 h, MeOH (10 mL) was added to the mixture and the resulting orange precipitate filtered, extensively washed with MeOH, CH_2Cl_2 and dried under high vacuum. Yield: 62 mg (83%). IR 3310, 1740 cm^{-1} .

^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 1.23 (m, 48 H), 1.39 (m, 24 H), 1.77 (m, 24 H), 2.15 (m, 24 H), 2.63 (m, 24 H), 2.85 (m, 12 H), 2.96 (m, 12 H), 3.10 (m, 12 H), 3.28 (m, 12 H), 3.46 (m, 12 H), 3.61 (m, 12 H), 3.68 (m, 24 H), 4.27 (m, 48 H), 7.81 (s, 12 H).

^{13}C NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 21.3, 23.9, 25.7, 26.2, 27.6, 29.6, 45.5, 49.1, 51.9, 56.3, 58.3, 66.4, 66.5, 68.8, 70.2, 78.2, 121.7, 140.7, 144.9, 145.5, 162.7.

Preparation of model multivalent β CD conjugate by CuAAC (124).



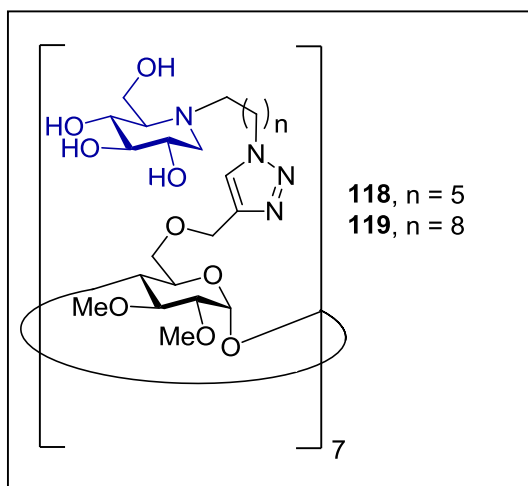
Compound **124** was prepared following general procedure for CuAAC reactions, starting from **202** (35 mg, 0.022 mmol) and 6-azido-1-hexanol (28.5 mg, 0.199 mmol). Yield: 36 mg (63%). $[\alpha]_D + 84.5$ (c 1.0, MeOH). IR 3422 cm^{-1} .

^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ 1.24-1.45 (m, 28 H, H-12 and H-13), 1.47-1.58 (m, 14 H, H-14), 1.90 (quint, 14 H, H-11), 3.10 (dd, 7 H, $J = 9.5$ and 3.6 Hz, H-2), 3.41-3.56 (m, 49 H, H-3, H-4, H-15 and OMe), 3.57-3.71 (m, 28 H, H-6a and OMe), 3.78 (br d, 7 H, $J = 9.6$ Hz, H-5), 3.93 (br dd, 1 H, $J = 11.0$ and 3.4 Hz, H-6b), 4.37 (t, 14 H, $J = 7.2$ Hz, H-10), 4.54 (d, 7 H, $J = 12.4$ Hz, H-7a), 4.60 (d, 7 H, $J = 12.4$ Hz, H-7b), 5.05 (d, 7 H, $J = 3.5$ Hz, H-1), 7.99 (s, 7 H, H-9).

^{13}C NMR (75.5 MHz, CD_3OD) δ 26.4 (C-13 or C-12), 27.4 (C-12 or C-13), 31.5 (C-11), 33.4 (C-14), 51.3 (C-10), 59.0 (OMe), 61.9 (OMe), 62.7 (C-15), 65.2 (C-7), 70.6 (C-6), 72.3 (C-5), 80.9 (C-4), 83.1 (C-2), 83.5 (C-3), 99.7 (C-1), 125.2 (C-9), 145.9 (C-8).

MALDI-TOF-MS m/z 2621.356 $[M + Na]^+$, calcd. for $C_{119}H_{203}N_{21}NaO_{42}$ 2621.43.

Preparation of multivalent DNJ- β CD conjugates by CuAAC.



Heptavalent conjugate 118. Compound **100** (103 mg, 0.35 mmol), **202** (72 mg, 0.045 mmol), $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (7.8 mg, 0.031 mmol), sodium ascorbate (12.4 mg, 0.063 mmol), and 2,6-lutidine (11 mL, 0.095 mmol) in 1:1 THF- H_2O (5 mL) were successively added. The resulting suspension was heated under microwave irradiation at 120 °C for 1 h. Solvents were evaporated and, to facilitate purification, the resulting residue was directly acetylated by adding 1:1 Ac_2O -Py (10 mL) at 0 °C and stirred at rt overnight. The reaction was quenched by the addition of water (10 mL) at 0 °C, and then extracted with CH_2Cl_2 (3 x 10 mL). The combined organic layers were washed with aqueous 2 M HCl (2 x 10 mL) and saturated aqueous $NaHCO_3$ (10 mL), dried ($MgSO_4$), filtered, and concentrated. The resulting residue was purified by flash chromatography using 97:3 to 90:10 CH_2Cl_2 -MeOH as eluent. The acetylated compound was directly dissolved in MeOH (5 mL) and deacetylated under Zemplén conditions by adding methanolic 1 M NaOMe solution (0.13 mL). The reaction was stirred at rt for 3 h, then solid CO_2 was added portion wise until pH 7, and the mixture was concentrated. Purification by gel

permeation chromatography (Sephadex G-25, 1:1 MeOH/water). Yield: 77 mg (48%). R_f 0.16 (6:3:4 MeCN-H₂O-NH₄OH). $[\alpha]_D^{25} + 53.5$ (c 1.0, H₂O). IR 3352 (OH) cm⁻¹.

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD, 333 K) δ 7.93 (s, 7 H, H-9), 5.12-5.03 (m, 7 H, H-1), 4.69-4.52 (m, 14 H, H-7), 4.41-4.32 (m, 14 H, H-12'), 4.08-3.43 (m, 35 H, H-3, H-4, H-5 and H-6), 3.86 (dd, 7 H, J = 11.8, 2.6 Hz, H-6'a), 3.81 (dd, 7 H, J = 11.8, 3.0 Hz, H-6'b), 3.62 (s, 21 H, OMe), 3.49 (s, 21 H, OMe), 3.48-3.43 (m, 7 H, H-2'), 3.35 (t, 7 H, J = 9.1 Hz, H-4'), 3.14 (t, 7 H, J = 9.1 Hz, H-3'), 3.13-3.08 (m, 7 H, H-2), 2.99 (dd, 7 H, J = 11.3, 4.9 Hz, H-1'a), 2.79 (dt, 7 H, J = 13.8, 8.3 Hz, H-7'a), 2.49 (dt, 7 H, J = 13.8, 7.5 Hz, H-7'b), 2.14-2.09 (m, 7 H, H-5'), 2.13 (t, 7 H, J = 10.7, H-1'b), 1.97-1.86 (m, 14 H, H-11'), 1.54-1.44 (m, 14 H, H-8'), 1.42-1.28 (m, 28 H, H-9 and H-10').

¹³C NMR (125.7 MHz, CD₃OD, 313 K) δ 146.0, 125.2, 99.6, 83.5, 80.7, 72.3, 70.9, 67.6, 65.4, 61.8, 60.0, 59.1, 57.8, 53.7, 51.3, 31.4, 28.1, 27.5, 25.5.

MALDI-TOF-MS m/z calcd. for C₁₆₁H₂₈₁N₂₈O₆₃ 3617.10 [M + H]⁺; found 3617.54.

Heptavalent conjugate 119. Compound **106** (110 mg, 0.33 mmol), **202** (69 mg, 0.043 mmol), CuSO₄·5H₂O (7.5 mg, 0.030 mmol), sodium ascorbate (11.9 mg, 0.060 mmol), and 2,6-lutidine (11 mL, 0.091 mmol) in 1:1 THF-H₂O (5 mL) were successively added. The resulting suspension was heated under microwave irradiation at 120 °C for 1 h. Solvents were evaporated and, to facilitate purification, the resulting residue was directly acetylated by adding 1:1 Ac₂O-Py (10 mL) at 0 °C and stirred at rt overnight. The reaction was quenched by the addition of water (10 mL) at 0 °C, and then extracted with CH₂Cl₂ (3 x 10 mL). The combined organic layers were washed with aqueous 2 M HCl (2 x 10 mL) and saturated aqueous NaHCO₃ (10 mL), dried (MgSO₄), filtered, and concentrated. The resulting residue was purified by flash chromatography using 97:3 to 90:10 CH₂Cl₂-MeOH as eluent. The acetylated compound was directly dissolved in MeOH (5 mL) and deacetylated under Zemplén conditions. The reaction was stirred at rt for 3 h, then solid CO₂ was added portionwise until pH 7, and the mixture was

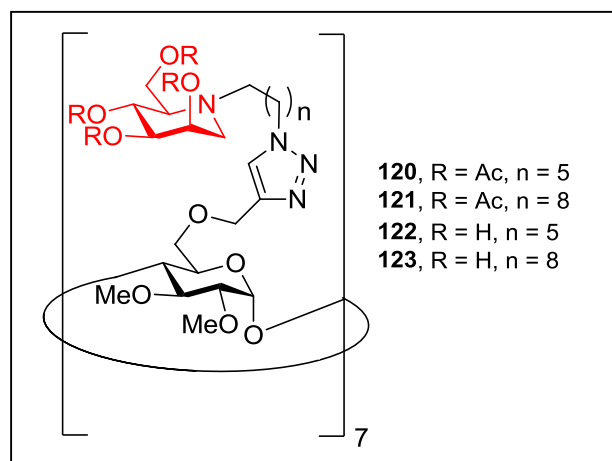
concentrated. Purification by gel permeation chromatography (Sephadex G-25, 1:1 MeOH/water). Yield: 71 mg (42%). R_f 0.28 (6:3:4 MeCN-H₂O-NH₄OH). $[\alpha]_D + 49.7$ (c 1.0, H₂O). IR 3340 cm⁻¹.

¹H NMR (500 MHz, CD₃OD, 333 K) δ 7.92 (s, 7 H, H-9), 5.13-5.00 (m, 7 H, H-1), 4.71-4.50 (m, 14 H, H-7), 4.40-4.31 (m, 14 H, H-15'), 4.08-3.42 (m, 35 H, H-3, H-4, H-5 and H-6), 3.86 (dd, 7 H, $J = 12.0, 2.9$ Hz, H-6'a), 3.83 (dd, 7 H, $J = 12.0, 2.7$ Hz, H-6'b), 3.62 (s, 21 H, OMe), 3.49 (s, 21 H, OMe), 3.48-3.44 (m, 7 H, H-2'), 3.36 (t, 7 H, $J = 9.1$ Hz, H-4'), 3.14 (t, 7 H, $J = 9.1$ Hz, H-3'), 3.13-3.08 (m, 7 H, H-2), 3.00 (dd, 7 H, $J = 11.1, 4.8$ Hz, H-1'a), 2.79 (dt, 7 H, $J = 13.4, 8.0$ Hz, H-7'a), 2.50 (dt, 7 H, $J = 13.4, 9.0$ Hz, H-7'b), 2.15 (t, 7 H, $J = 11.1, H-1'b$), 2.15-2.10 (m, 7 H, H-5'), 1.96-1.85 (m, 14 H, H-14'), 1.52-1.44 (m, 14 H, H-8'), 1.40-1.23 (m, 70 H, H-9', H-10', H-11', H-12 and H-13').

¹³C NMR (125.7 MHz, CD₃OD, 313 K) δ 146.0, 125.2, 99.8, 83.5, 80.7, 72.3, 70.8, 67.5, 65.3, 61.8, 59.9, 58.6, 57.8, 53.8, 51.4, 31.4, 30.6, 30.1, 28.6, 27.6, 25.6.

MALDI-TOF-MS m/z calcd. for C₁₈₂H₃₂₃N₂₈O₆₃ 3911.66 [M + H]⁺; found 3911.31.

Preparation of heptavalent DMJ- β CD conjugates by CuAAC.



Heptavalent conjugate 120. Compound **120** was prepared following general procedure for CuAAC reaction, starting from **202** (17.7 mg, 0.011 mmol) and **112** (38.9 mg, 0.085 mmol). Yield: 27.8 mg (52%). $[\alpha]_D + 12.5$ (c 0.6, CHCl_3). IR 1746 cm^{-1} .

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.27-1.37 (m, 28 H, H-9' and H-10'), 1.36-1.48 (m, 14 H, H-8'), 1.86 (br t, 14 H, $J = 6.7\text{ Hz}$, H-11'), 2.01 (s, 21 H, C(O)CH_3), 2.04 (s, 21 H, C(O)CH_3), 2.07 (s, 21 H, C(O)CH_3), 2.10 (s, 21 H, C(O)CH_3), 2.56-2.80 (m, 28 H, H-7', H-5' and H-1'a), 3.04 (dd, 7 H, $J = 13.3$ and 4.6 Hz , H-1'b), 3.14 (dd, 7 H, $J = 9.8$ and 3.1 Hz , H-2), 3.41-3.55 (m, 28 H, OMe and H-3), 3.57-3.75 (m, 35 H, OMe, H-4 and H-6a), 3.81 (br d, 7 H, $J = 9.7\text{ Hz}$, H-5), 3.90-4.01 (m, 7 H, H-6a), 4.16-4.26 (m, 14 H, H-6'), 4.30 (t, 14 H, $J = 7.2\text{ Hz}$, H-12'), 4.55 (d, 7 H, $J = 12.2\text{ Hz}$, H-7a), 4.64 (d, 7 H, $J = 12.2\text{ Hz}$, H-7b), 4.96 (dd, 7 H, $J = 8.6$ and 3.7 Hz , H-3'), 5.09 (br d, 7 H, $J = 3.3\text{ Hz}$, H-1), 5.20-5.28 (m, 14 H, H-4' and H-2'), 7.63 (s, 7 H, H-9).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 20.9, 21.0, 21.1 and 21.3 (C(O)CH_3), 25.0 (C-8'), 26.6, 26.8 (C-9' and C-10'), 30.5 (C-11'), 50.3 (C-12'), 51.0 (C-1'), 52.8 (C-7'), 58.8 (OMe), 60.0 (C-6'), 61.3 (C-5'), 61.6 (OMe), 65.1 (C-7), 67.3 (C-2'), 68.0 (C-4'), 71.2 (C-5), 71.8 (C-3'), 80.3 (C-4), 82.0 (C-3), 82.3 (C-2), 99.2 (C-1), 122.8 (C-9), 145.1 (C-8), 169.8, 170.1, 170.7 and 171.0 (C=O).

MALDI-TOF-MS m/z 4792.0 $[M + H]^+$, calcd. for $C_{217}H_{337}N_{28}O_{91}$ 4291.26.

Heptavalent conjugate 121. Compound **121** was prepared following general procedure for CuAAC, starting from **202** (12.4 mg, 7.8 μ mol) and **113** (30.0 mg, 0.060 mmol). Yield: 37 mg (94%). $[\alpha]_D + 7.9$ (c 1.0, $CHCl_3$). IR 1741 cm^{-1} .

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 1.10-1.50 (m, 84 H, H-8', H-9', H-10', H-11', H-12' and H-13'), 1.76-1.92 (m, 14 H, H-14'), 2.00 (s, 21 H, $C(O)CH_3$), 2.04 (s, 21 H, $C(O)CH_3$), 2.07 (s, 21 H, $C(O)CH_3$), 2.11 (s, 21 H, $C(O)CH_3$), 2.56-2.76 (m, 28 H, H-7', H-5' and H-1'a), 3.06 (dd, 7 H, $J = 13.4$ and 4.8 Hz, H-1'b), 3.13 (dd, 7 H, $J = 9.6$ and 3.2 Hz, H-2), 3.37-3.54 (m, 28 H, OMe and H-3), 3.55-3.73 (m, 35 H, OMe, H-4 and H-6a), 3.80 (br d, 7 H, $J = 9.4$ Hz, H-5), 3.94 (br d, 7 H, $J = 9.7$ Hz, H-6a), 4.14-4.24 (m, 14 H, H-6'), 4.28 (t, 14 H, $J = 7.2$ Hz, H-15'), 4.54 (d, 7 H, $J = 12.2$ Hz, H-7a), 4.64 (d, 7 H, $J = 12.2$ Hz, H-7b), 4.95 (dd, 7 H, $J = 8.7$ and 3.6 Hz, H-3'), 5.08 (br d, 7 H, $J = 3.2$ Hz, H-1), 5.20-5.30 (m, 14 H, H-4' and H-2'), 7.64 (s, 7 H, H-9).

^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 20.9, 21.0, 21.1, 21.3 ($C(O)CH_3$), 24.9, 26.7, 27.3, 29.2, 29.62, 29.63, 30.5 (C-8', C-9', C-10', C-11', C-12', C-13', C-14'), 50.4 (C-12'), 51.1 (C-1'), 52.9 (C-7'), 58.8 (OMe), 60.0 (C-6'), 61.2 (C-5'), 61.6 (OMe), 65.0 (C-7), 67.3 (C-2'), 68.0 (C-4'), 71.2 (C-5), 71.8 (C-3'), 80.3 (C-4), 81.9 (C-3), 82.2 (C-2), 99.2 (C-1), 122.8 (C-9), 145.0 (C-8), 169.8, 170.1, 170.7 and 171.1 (C=O).

MALDI-TOF-MS m/z 5110.22 $[M + Na]^+$, calcd. for $C_{238}H_{378}N_{28}O_{91}Na$ 5109.58.

Heptavalent conjugate 122. Compound **122** was prepared following general procedure for deacetylation, starting from **120** (20 mg, 0.004 mmol). Yield: 13 mg (87%). $[\alpha]_D + 30.5$ (c 1.0, MeOH). IR 3375 cm^{-1} .

1H NMR (300 MHz, CD_3OD , 323 K) δ 1.31-1.42 (m, 28 H, H-9' and H-10'), 1.47 (qt, 14 H, $J = 7.0$ Hz, H-8'), 1.82-1.99 (m, 14 H, H-11'), 2.12 (dt, 7 H, $J = 8.8$ and 2.8 Hz, H-5), 2.43 (dd, 7 H, $J = 12.3$ and 1.6 Hz, H-1'a), 2.47-2.58 (m, 7 H, H-7'a), 2.71-2.81 (m, 7 H, H-7'b), 2.97 (dd, 7 H, $J = 12.3$ and 3.9 Hz, H-1'b), 3.10 (dd, 7 H, $J = 9.2$ and 3.5 Hz, H-2), 3.32-3.35 (m, 7 H, H-3'), 3.43-3.57 (m, 35 H, OMe, H-3, and H-4), 3.57-3.72 (m,

49 H, H-4', H-5, H-6 and OMe), 3.75-3.92 (m, 21 H, H-2' and H-6'), 4.36 (t, 14 H, $J = 7.0$ Hz, H-12'), 4.50-4.68 (m, 14 H, H-7), 5.07 (s, 7 H, H-1), 7.93 (s, 7 H, H-9). ^{13}C NMR (75 MHz, CD_3OD) δ 25.4 (C-8'), 27.5, 28.0 (C-9' and C-10'), 31.4 (C-11'), 51.3 (C-12'), 53.7 (C-7'), 56.5 (C-1'), 59.2 (OMe), 59.3 (C-6), 61.9 (OMe), 65.3 (C-7), 67.1 (C-5'), 69.6 (C-2'), 69.7 (C-4'), 70.5 (C-6), 72.4 (C-5), 76.6 (C-3'), 80.6 (C-4), 83.3 (C-2), 83.5 (C-3), 99.5 (C-1), 125.3 (C-9), 145.9 (C-8).

MALDI-TOF-MS average m/z 3615.08 $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd. for $\text{C}_{161}\text{H}_{281}\text{N}_{28}\text{O}_{63}$ 3614.97.

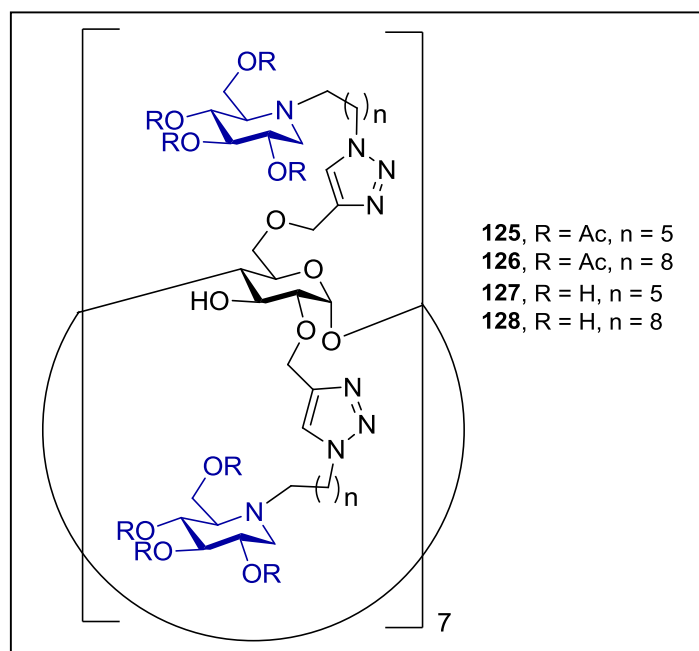
Heptavalent conjugate 123. Compound **123** was prepared following general procedure for deacetylation, starting from **121** (34 mg, 7.3 μmol). Yield: 26 mg (91%). $[\alpha]_{\text{D}} + 23.0$ (c 1.0, MeOH). IR 3376 cm^{-1} .

^1H NMR (300 MHz, CD_3OD) δ 1.22-1.40 (m, 70 H, H-9', H-10', H-11', H-12', H-13'), 1.41-1.54 (m, 14 H, H-8'), 1.83-1.94 (m, 14 H, H-14'), 2.10-2.15 (m, 7 H, H-5'), 2.45-2.52 (m, 7 H, H-1'a), 2.53-2.65 (m, 7 H, H-7'a), 2.68-2.81 (m, 7 H, H-7'b), 2.99 (dd, 7 H, $J = 12.3$ and 3.7 Hz, H-1'b), 3.05-3.16 (m, 7 H, H-2), 3.29-3.34 (m, 7 H, H-3'), 3.38-3.57 (m, 35 H, OMe, H-3, H-4), 3.57-3.75 (m, 49 H, H-4', H-5, H-6 and OMe), 3.78-3.95 (m, 21 H, H-2' and H-6'), 4.30-4.43 (m, 14 H, H-12'), 4.46-4.73 (m, 14 H, H-7), 4.95-5.16 (m, 7 H, H-1), 8.03 (s, 7 H, H-9).

^{13}C NMR (75 MHz, CD_3OD) δ 25.3, 27.6, 28.6, 30.1, 30.6 (2C), 31.4 (C-8', C-9', C-10', C-11', C-12', C-13', C-14'), 51.4 (C-15'), 53.9 (C-7'), 56.5 (C-1'), 59.2 (C-6' and OMe), 62.0 (OMe), 65.2 (C-7), 67.0 (C-5'), 69.6 (C-2' and C-4'), 70.5 (C-6), 72.3 (C-5), 76.6 (C-3'), 80.6 (C-4), 83.1 (C-2), 83.5 (C-3), 99.7 (C-1), 125.3 (C-9), 145.8 (C-8).

MALDI-TOF-MS average m/z 3932.9 $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd. for $\text{C}_{182}\text{H}_{322}\text{N}_{28}\text{O}_{63}\text{Na}$ 3933.3.

Preparation of 2,6-tetradecavalent DNJ- β CD conjugates by CuAAC.



Tetradecavalent conjugate 125. Compound **107** (75 mg, 0.164 mmol), **203** (17.8 mg, 0.011 mmol), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (3.7 mg, 0.015 mmol), and sodium ascorbate (5.9 mg, 0.030 mmol) in DMF- H_2O (6:1, 1.4 mL) were successively added. The resulting suspension was heated under MW at 80 °C for 25 min. A few mL of H_2O were added and the aqueous phase was extracted with EtOAc (3 x 10 mL). The combined organic layers were washed with water (10 mL), then dried (Na_2SO_4) and concentrated. The residue was purified by flash chromatography using 98:2 \rightarrow 90:10 CH_2Cl_2 -MeOH as eluent. To remove Cu from the product, the residue was dissolved in CH_2Cl_2 (1 mL), NH_4OH (10%, 3 mL) was added, and the mixture was stirred for 15 min. The phases were separated and the aqueous phase was extracted with CH_2Cl_2 (2 x 1 mL). The combined organic layers was dried (Na_2SO_4) and concentrated. The residue was purified by flash chromatography 98:2 \rightarrow 90:10 CH_2Cl_2 -MeOH as eluent. Yield: 53 mg (62%). R_f 0.26 (95:5 CH_2Cl_2 -MeOH). $[\alpha]_D + 11.9$ (c 1.0, CHCl_3). IR 3432, 1742 cm^{-1} .

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , 300 K) δ 7.85-7.50 (m, 14 H, H-9 and H-12), 5.12-4.83 (m, 56 H, H-3', H-4', H-2 and H-7 or H-10), 4.81-4.69 (m, 7 H, H-1), 4.56 (d, 7 H, $J = 12.6$ Hz, H-7a or H-10a), 4.50 (d, 7 H, $J = 12$ Hz, H-7b or H-10b), 4.41-4.22 (m, 28 H, H-12'), 4.13 (m, 28 H, H-6'), 3.91 (t, 7 H, $J = 8.8$ Hz, H-3), 3.76-3.57 (m, 21 H, H-6, H-5), 3.46 (dd, 7 H, $J = 8.9, 2.5$ Hz, H-2), 3.38 (t, 7 H, $J = 9.2$ Hz, H-4), 3.16 (dd, 14 H, $J = 11.2, 4.6$ Hz, H-1a'), 2.80-2.65 (m, 14 H, H-7a'), 2.61 (dd, 14 H, $J = 6.1, 2.3$ Hz, H-5'), 2.58-2.45 (m, 14 H, H-7b'), 2.28 (t, 14 H, $J = 10.5$, H-1b'), 2.05 (s, 42 H, $\text{C}=\text{OCH}_3$), 2.00 (s, 79 H, $\text{C}=\text{OCH}_3$), 1.99 (s, 47 H, $\text{C}=\text{OCH}_3$), 1.94-1.79 (m, 28 H, H-11'), 1.55-1.12 (m, 84 H, H-8', H-9 and H-10').

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3 , 301 K) δ 170.7, 170.3, 170.0, 169.7, 144.7, 144.1, 123.6, 122.9, 101.6, 82.9, 79.1, 74.7, 73.3, 70.3, 69.6, 69.4, 68.7, 65.2, 64.8, 61.6, 59.6, 52.9, 51.7, 50.3, 50.2, 30.4, 26.7, 26.5, 24.9, 20.9, 20.68, 20.73 ppm.

MALDI-TOF-MS m/z calcd. for $\text{C}_{364}\text{H}_{546}\text{N}_{56}\text{O}_{147}$ 8058.52; found 8058.39.

Tetradecavalent conjugate 126. Compound **108** (110 mg, 0.221 mmol), **203** (24.5 mg, 0.015 mmol), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (5.1 mg, 0.021 mmol), and sodium ascorbate (8.1 mg, 0.041 mmol) in 6:1 DMF- H_2O (3.5 mL) were successively added. The resulting suspension was heated under MW at 80 °C for 25 min. A few mL of water were added and the aqueous phase was extracted with EtOAc (3 x 12 mL). The combined organic layers were washed with H_2O (12 mL), then dried (Na_2SO_4) and concentrated. The residue was purified by flash chromatography using 98:2 \rightarrow 90:10 CH_2Cl_2 -MeOH as eluent. To remove Cu from the product, the residue was dissolved in CH_2Cl_2 (1 mL), NH_4OH (10%, 3 mL) was added, and the mixture was stirred for 15 min. The phases were separated and the aqueous phase was extracted with CH_2Cl_2 (2 x 1 mL). The combined organic layers were dried (Na_2SO_4) and concentrated. The residue was purified by flash chromatography using 98:2 \rightarrow 90:10 CH_2Cl_2 -MeOH as eluent. Yield: 69 mg (54%). R_f 0.33 (95:5 CH_2Cl_2 -MeOH). $[\alpha]_D + 16.6$ (c 0.5, CHCl_3). IR 3427, 1745 cm^{-1} .

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3 , 300 K) δ 7.83-7.50 (m, 14 H, H-9 and H-12), 5.24-4.81 (m, 56 H, H-3', H-4', H-2' and H-7 or H-10), 4.81-4.66 (m, 7 H, H-1), 4.60-4.41 (m, 14 H, H-7 or H-10), 4.39-4.18 (m, 28 H, H-15'), 4.12 (m, 28 H, H-6'), 3.90 (t, 7 H, J = 8.2 Hz, H-3), 3.80-3.52 (m, 21 H, H-6 and H-5), 3.52-3.27 (m, 14 H, H-2 and H-4), 3.16 (dd, 14 H, J = 4.7, 11.3 Hz, H-a'), 2.77-2.44 (m, 14 H, H-7a'), 2.61 (d, 14 H, J = 8.8 Hz, H-5'), 2.57-2.47 (m, 14 H, H-7b'), 2.29 (t, 14 H, J = 10.8 Hz, H-1b'), 2.04 (s, 43 H, $\text{C}=\text{CH}_3$), 1.99 (s, 76 H, $\text{C}=\text{OCH}_3$), 1.98 (s, 49 H, $\text{C}=\text{OCH}_3$), 1.93-1.77 (m, 28 H, H-14'), 1.46-1.34 (m, 28 H, H-8'), 1.34-1.12 (m, 140 H, H-9', H-10', H-11', H-12 and H-13').

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3 , 301 K) δ 170.9, 170.4, 170.0, 169.8, 144.7, 144.1, 123.6, 122.9, 101.7, 83.0, 79.1, 74.8, 73.4, 70.3, 69.6, 69.5, 68.7, 65.2, 64.9, 61.5, 59.6, 53.0, 51.9, 50.4, 50.3, 30.5, 29.6, 29.1, 27.3, 26.7, 24.8, 20.95, 20.92, 20.8, 20.75.

MALDI-TOF-MS m/z calcd. for $\text{C}_{406}\text{H}_{630}\text{N}_{56}\text{O}_{147}$ 8647.63; found 8646.31.

Tetradecavalent conjugate 127. Compound **125** (86 mg, 0.0107 mmol) was dissolved in $\text{MeOH-H}_2\text{O}$ (1:1, 1.8 mL), Amberlite resin IRA 400 OH^- (3.31 g) was added, and the mixture was stirred for 4 h at 27 °C. The resin was then filtered and washed with MeOH and H_2O . The solvent was evaporated to give **127**. Yield: 59 mg (96%). $[\alpha]_{\text{D}} + 26.6$ (c 0.14, H_2O). IR 3327 cm^{-1} .

^1H NMR (300 MHz, D_2O , 300 K) δ 8.08 (s, 7 H, H-9 or H-12), 8.03-7.82 (br s, 7 H, H-9 or H-12), 5.02-4.89 (m, 14 H, H-7 or H-10), 4.86-4.74 (m, 21 H, H-1 and H-7 or H-10), 4.56-4.11 (m, 42 H, H-12 and H-6 or H-5 and H-4), 4.03-3.42 (m, 28 H, H-2, H-3 and H-5, H-4 or H-6), 3.80 (m, 28 H, H-6'), 3.58-3.48 (m, 14 H, H-2'), 3.37 (t, 14 H, J = 9.1 Hz, H-4'), 3.23 (t, 14 H, J = 9.3 Hz, H-3'), 2.97 (dd, 14 H, J = 10.8, 4.2 Hz, H-1a'), 2.77-2.40 (m, 28 H, H-7'), 2.32-2.12 (m, 28 H, H-1b and H-5'), 1.91-1.65 (m, 28 H, H-11'), 1.47-1.30 (m, 28 H, H-8'), 1.28-1.07 (m, 56 H, H-10', H-11').

^{13}C NMR (100 MHz, D_2O , 300 K) δ 143.8, 143.4, 125.3, 124.7, 100.4, 81.8, 79.4, 78.4, 72.7, 70.5, 70.1, 68.9, 68.6, 65.1, 64.5, 57.6, 55.5, 51.9, 50.4, 50.2, 29.6, 26.3, 26.2, 25.6, 25.4, 22.6, 22.5.

MALDI-TOF-MS m/z calcd. for $C_{252}H_{434}N_{56}O_{91}$ 5704.46; found: 5703.53.

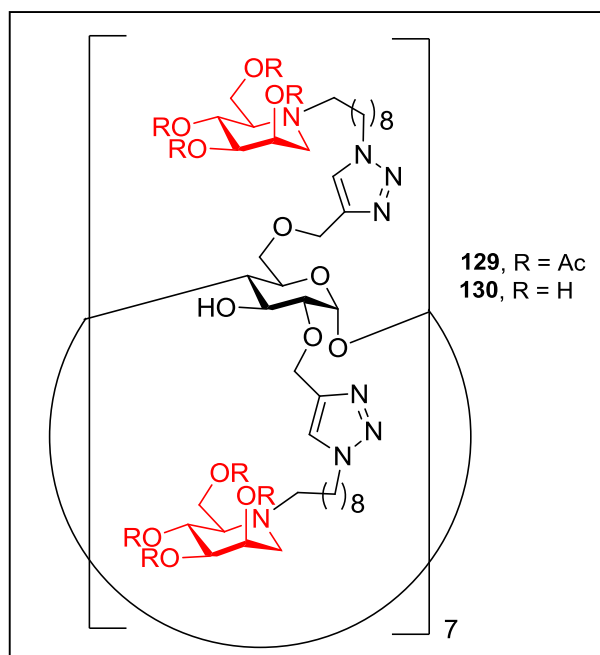
Tetradecavalent conjugate 128. Compound **126** (69 mg, 0.0080 mmol) was dissolved in MeOH-H₂O (1:1, 4.8 mL), Amberlite resin IRA 400 OH⁻ (1.4 meq/mL, 2.47 g) was added, and the mixture was stirred for 5.5 h at 27 °C. The resin was then filtered and washed with MeOH and H₂O. The solvent was evaporated to give **128**. Yield: 43 mg (85%). $[\alpha]_D + 11.7$ (c 0.54, MeOH + 3 drops of H₂O). IR (neat) 3352 (OH) cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, 9:1 MeOD-D₂O, 300 K) δ 8.09 (s, 7 H, H-9 or H-12), 8.09 (s, 7 H, H-9 or H-12), 4.99 (d, 14 H, J = 13.1 Hz, H-7a and H-10a), 4.91-4.73 (m, 21 H, H-1, H-7b and H-10b), 4.65-4.48 (m, 14 H, H-6 or H-5 and H-4), 4.42 (t, 14 H, J = 6.5 Hz, H-15'), 4.31 (s, 14 H, H-15'), 3.97-3.79 (m, 35 H, H-6 and H-3), 3.79-3.60 (m, 14 H, H-6 or H-4 and H-5), 3.56-3.47 (m, 21 H, H-2 and H-2'), 3.37 (t, 14 H, J = 9.1 Hz, H-4'), 3.18 (t, 14 H, J = 9.1 Hz, H-3'), 2.98 (dd, 14 H, J = 11.1, 4.7 Hz, H-1a'), 2.81-2.68 (m, 14 H, H-7'a), 2.66-2.51 (m, 14 H, H-7'b), 2.20 (t, 14 H, J = 10.8 Hz, H-1'b), 2.14 (d, 14 H, J = 9.4 Hz, H-5'), 1.89 (t, 14 H, J = 6.0 Hz, H-14'), 1.83 (t, 14 H, J = 6.0 Hz, H-14'), 1.46 (t, 28 H, J = 6.0 Hz, H-8'), 1.35-1.18 (m, 140 H, H-9', H-10', H-11', H-12 and H-13').

¹³C NMR (100 MHz, 9:1 MeOD-D₂O, 301 K) δ 145.6, 145.0, 125.9, 125.3, 102.2, 83.9, 80.9, 80.3, 74.4, 71.8, 70.5, 70.2, 67.0, 65.9, 65.0, 59.4, 57.4, 53.7, 51.4, 51.3, 31.3, 31.2, 30.5, 30.4, 29.95, 29.89, 28.54, 28.50, 27.4, 24.8 ppm.

MALDI-TOF-MS average m/z calcd. for $C_{294}H_{518}N_{56}O_{91}$ 6293.58; found 6294.95.

Preparation of 2,6-tetradecavalent DMJ- β CD conjugates by CuAAC.



Tetradecavalent conjugate 129. Compound **129** was prepared following general procedure for CuAAC reaction, starting from **203** (6.5 mg, 0.004 mmol) and **113** (38.9 mg, 0.085 mmol). Yield: 21 mg (67%). $[\alpha]_D - 22.2$ (*c* 1.0, MeOH). IR 3448, 1742 cm^{-1} .

^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 1.12-1.34 (m, 140 H, H-9', H-10', H-11', H-12' and H-13'), 1.34-1.46 (m, 28 H, H-8'), 1.77-1.95 (m, 28 H, H-14'), 2.00 (s, 42 H, $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 2.04 (s, 42 H, $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 2.07 (s, 42 H, $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 2.11 (s, 42 H, $\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 2.56- 2.77 (m, 56 H, H-7', H-5', H-1a'), 3.04 (dd, 14 H, $J = 4.8$ and 13.2 Hz, H-1b'), 3.27-3.80 (m, 35 H, H-2, H-4, H-5, H-6), 3.82-4.00 (m, 7 H, H-3), 4.13-4.41 (m, 56 H, H-6', H-15'), 4.42-4.62 (m, 14 H, H-7 or H-10), 4.66-4.83 (m, 7 H, H-1), 4.86-5.08 (m, 42 H, H-3', H-7 or H-10), 5.17-5.31 (m, 28 H, H-4', H-2'), 7.52-7.84 (m, 14 H, H-9 and H-12).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 20.9, 21.0, 21.1, 21.2 ($\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$), 24.9 (C-8'), 26.7, 27.3, 29.2, 29.6, 29.7 (C-9' to C-13'), 30.6 (C-14'), 50.4, 50.5 (C-15'), 51.2 (C-7'),

52.9 (C-1'), 60.0 (C-6'), 61.2 (C-5'), 65.0, 65.2 (C-7 and C-10), 67.3 (C-2'), 68.0 (C-4'), 68.8 (C-6), 70.4 (C-5), 71.9 (C-3'), 73.4 (C-3), 79.0 (C-2), 83.0 (C-4), 101.7 (C-1), 123.0, 123.8 (C-9 and C-12), 144.0, 144.5 (C-8 and C-11), 170.0, 170.2, 170.7, 171.0 (C=OCH₃).

MALDI-TOF-MS m/z 8669.86, calcd. for C₄₀₆H₆₃₀N₅₆O₁₄₇Na 8670.36.

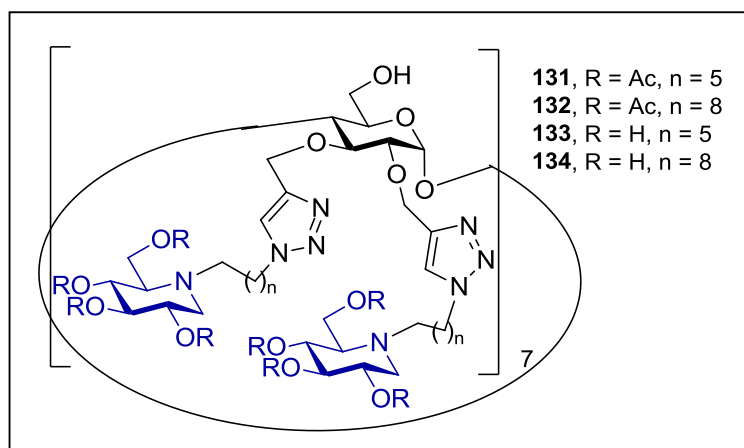
Tetradecavalent conjugate 130. Compound **1303** was prepared following Zemplen conditions, starting from **129** (22 mg, 2.5 μ mol). Yield: 16 mg (100%). [α]_D -11.0 (*c* 0.54, MeOH + 3 drops of H₂O). IR 3374 cm⁻¹.

¹H NMR (500 MHz, 9:1 CD₃OD+D₂O) δ 1.25-1.45 (m, 140 H, H-9', H-10', H-11', H-12' and H-13'), 1.46-1.58 (m, 28 H, H-8'), 1.85-2.02 (m, 28 H, H-14'), 2.14-2.22 (m, 14 H, H-5'), 2.49-2.59 (m, 14 H, H-1'a), 2.60-2.72 (m, 14 H, H-7'a), 2.73-2.86 (m, 14 H, H-7'b), 2.98-3.08 (m, 14 H, H-1b'), 3.40-3.43 (m, 14 H, H-3'), 3.44-3.54 (m, 7 H, H-2), 3.56-3.64 (m, 7H, H-4), 3.71-4.00 (m, 84H, H-4', H-6, H-2', H-6', H-5 and H-3), 4.31-4.44 (m, 14 H, H-15'), 4.44-4.53 (m, 14 H, H-15'), 4.55-4.71 (m, 14 H, H-7 or H-10), 4.77-4.88 (m, 14 H, H-1, H-7a or H-10a), 5.07 (d, 7 H, *J* = 12.3 Hz, H-7b or H-10b), 8.02 (s, 7 H, H-9 or H-12), 8.16 (s, 7 H, H-9 or H-12).

¹³C NMR (100 MHz, 9:1 CD₃OD+D₂O) δ 25.15, 25.23 (C-8'), 27.5, 28.57, 28.61, 30.00, 30.04, 30.49, 30.52, 30.6 (C-9' to C-13'), 31.3, 31.4 (C-14'), 51.3, 51.5 (C-15'), 53.9 (C-7'), 56.5, 56.6 (C-1'), 59.1, 59.2 (C-6'), 65.2, 66.1 (C-7 and C-10), 66.85, 66.92 (C-5'), 69.60 (C-2'), 69.65 (C-4'), 70.3 (C-6), 72.0 (C-5), 74.6 (C-3), 76.5 (C-3'), 81.1 (C-2), 84.3 (C-4), 102.4 (C-1), 125.2, 125.8 (C-9 and C-12), 145.1, 145.8 (C-8 and C-11).

MALDI-TOF-MS m/z 6316.8, calcd. for C₂₉₄H₅₁₈N₅₆O₉₁Na 6315.8.

Preparation of 2,3-tetradecavalent DNJ- β CD conjugates by CuAAC.



Tetradecavalent conjugate 131. Compound **131** was prepared following general procedure for CuAAC reaction, starting from **204** (22.5 mg, 0.014 mmol) and **107** (94.8 mg, 0.208 mmol). Yield: 39 mg (36%). $[\alpha]_D + 24.5$ (c 1.0, CHCl_3). IR 3460, 1741 cm^{-1} .

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.12-1.68 (m, 84 H, H-8', H-9' and H-10'), 1.75-1.92 (m, 28 H, H-11'), 1.97-2.02 (m, 126 H, C(O)CH_3), 2.04 (s, 42 H, C(O)CH_3), 2.29 (td, 14 H, $J = 10.7$ and 2.3 Hz, H-1'a), 2.45-2.58 (m, 14 H, H-7'a), 2.58-2.65 (m, 14 H, H-5'), 2.65-2.76 (m, 14 H, H-7'b), 3.16 (br dt, 14 H, $J = 10.3$ and 3.9 Hz, H-1'b), 3.21-3.42 (br s, 7 H, OH), 3.47 (br d, 7 H, $J = 9.7$ Hz, H-2), 3.63 (t, 7 H, $J = 8.3$ Hz, H-4), 3.72-3.82 (m, 7 H, H-6a), 3.82-3.89 (m, 7 H, H-5), 3.95 (t, 14 H, $J = 8.5$ Hz, H-3 and H-6b), 4.13 (br s, 28 H, H-6'), 4.19-4.34 (m, 28 H, H-12'), 4.76 (d, 7 H, $J = 12.8$ Hz, H-7a or H-10a), 4.80-4.97 (m, 28 H, H-2', H-7 or H-10), 4.97-5.06 (m, 28 H, H-3' and H-4'), 5.12 (br s, 7 H, H-1), 5.20 (br d, 7 H, $J = 10.6$ Hz, H-7b or H-10b), 7.96 (s, 14 H, H-9 and H-12).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 20.79, 20.84, 20.97, 20.98 (C(O)CH_3), 24.8 and 24.9 (C-8'), 26.5, 26.7, 26.81 and 26.84 (C-9' and C-10'), 30.3 and 30.5 (C-11'), 50.2 (C-12'), 51.8 (C-7'), 53.0 (C-1'), 59.6 (C-6'), 61.6 (C-5'), 62.1 (C-6), 64.4 and 67.3 (C-7 and C-10), 69.5 (C-2'), 69.6 (C-3' or C-4'), 72.8 (C-5), 74.8 (C-3' or C-4'), 78.5 (C-2), 78.9

(C-4), 81.4 (C-3), 98.0 (C-1), 123.8 and 124.2 (C-9 and C-12), 144.7 and 145.3 (C-8 and C-11), 169.82, 169.84, 170.1, 170.2, 170.4, 170.87, 170.92 (C(O)CH₃).

MALDI-TOF-MS m/z 8054.93, calcd. for C₃₆₄H₅₄₆N₅₆O₁₄₇ 8054.70.

Tetradecavalent conjugate 132. Compound **132** was prepared following general procedure CuAAC reaction, starting from **204** (48 mg, 0.029 mmol) and **108** (221 mg, 0.443 mmol). [α]_D + 23.0 (*c* 1.0, CHCl₃). Yield: 161 mg (65%). IR 3475, 1743 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.11-1.28 (m, 140 H, H-9' to H-13'), 1.26-1.43 (m, 28 H, H-8'), 1.68-1.86 (m, 28 H, H-14'), 1.95 (s, 42 H, C(O)CH₃), 1.96 (s, 84 H, C(O)CH₃), 2.01 (s, 42 H, C(O)CH₃), 2.27 (t, 14 H, *J* = 10.5 Hz, H-1'a), 2.43-2.54 (m, 14 H, H-7'a), 2.58 (br d, 14 H, *J* = 8.9 Hz, H-5'), 2.61-2.71 (m, 14 H, H-7'b), 3.13 (dd, 14 H, *J* = 11.4 and 5.0 Hz, H-1'b), 3.43 (br d, 7 H, *J* = 8.0 Hz, H-2), 3.57 (t, 7 H, *J* = 6.6 Hz, H-4), 3.68-3.85 (m, 14 H, H-5 and H-6a), 3.85-4.03 (m, 14 H, H-3 and H-6b), 4.09 (s, 28 H, H-6'), 4.14-4.34 (m, 28 H, H-15'), 4.71 (br d, 7 H, *J* = 12.3 Hz, H-7a or H-10a), 4.74-4.85 (m, 14 H, H-7 or H-10), 4.85-4.94 (m, 14 H, H-2'), 4.94-5.06 (m, 28 H, H-3' and H-4'), 5.14 (br s, 14 H, H-1 and H-7b or H-10b), 7.90 (s, 7 H, H-9 or H-12), 7.95 (s, 7 H, H-9 or H-12).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 20.68, 20.73, 20.8, 20.9, (C(O)CH₃), 24.8 (C-8'), 26.6, 26.7, 27.26, 27.28, 29.05, 29.07, 29.5, 29.6 (C-9' to C-13'), 30.3 and 30.4 (C-14'), 50.16, 50.21 (C-15'), 51.8 (C-7'), 53.0 (C-1'), 59.6 (C-6'), 61.5 (C-5'), 61.9 (C-6), 64.2 and 67.2 (C-7 and C-10), 69.4, 69.5 (C-2' and C-3' or C-4'), 72.8 (C-5), 74.7 (C-3' or C-4'), 78.4 (C-2), 79.0 (C-4), 81.1 (C-3), 97.8 (C-1), 123.8 and 124.1 (C-9 and C-12), 144.7 and 145.1 (C-8 and C-11), 169.70, 169.96, 169.99, 170.3, 170.80, 170.83 (C(O)CH₃).

MALDI-TOF-MS m/z 8649.07 [M + H]⁺, calcd. for C₄₀₆H₆₃₁N₅₆O₁₄₇ 8648.64.

Tetradecavalent derivative 133. Compound **133** was prepared following Zemplen conditions, starting from **131** (33 mg, 4.09 μ mol). Yield: 20 mg (85%). [α]_D + 34.0 (*c* 0.33, H₂O). IR 3323 cm⁻¹.

^1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 0.98-1.15 (m, 56 H, H-9', H-10'), 1.19-1.42 (m, 28 H, H-8'), 1.56-1.77 (m, 28 H, H-11'), 2.08-2.24 (m, 28 H, H-1a' and H-5'), 2.42-2.55 (m, 14 H, H-7'a), 2.55-2.65 (m, 14 H, H-7'b), 2.84-2.96 (m, 14 H, H-1b'), 3.19 (td, 14 H, $J = 9.5$ and 2.3 Hz, H-3'), 3.32 (t, 14 H, $J = 9.4$ Hz, H-4'), 3.49 (td, 14 H, $J = 9.5$ and 5.0 Hz, H-2'), 3.59 (br d, 7 H, $J = 9.1$ Hz, H-2), 3.72-3.85 (m, 35 H, H-6' and H-4), 3.85-3.95 (m, 14 H, H-5 and H-6a), 3.94-4.06 (m, 14 H, H-3 and H-6b), 4.07-4.28 (m, 28 H, H-12'), 4.63-4.73 (m, 14 H, H-7 or H-10), 4.73-4.86 (m, 14 H, H-7 or H-10), 5.26 (br s, 7 H, H-1), 7.78 (s, 7 H, H-9 or H-12), 7.88 (s, 7 H, H-9 or H-12).

^{13}C NMR (100 MHz, D_2O) δ 22.6 (C-8'), 25.5, 25.6, 26.2, 26.4 (C9' and C-10'), 29.4, 29.6 (C-11'), 50.2 (C-12'), 51.9 (C-7'), 55.5 (C-1'), 57.6 (C-6'), 60.5 (C-6), 63.8 (C-7 or C-10), 65.1 (C-5'), 66.0 (C-7 or C-10), 68.9 (C-2'), 70.1 (C-4'), 72.0 (C-5), 78.4 (C-4 and C-3'), 78.7 (C-2), 80.4 (C-3), 97.8 (C-1), 124.2, 124.5 (C-9 and C-12), 144.6 (C-8 and C-11).

MALDI-TOF-MS m/z 5705.5 $[\text{M} + \text{H}]^+$, calcd. for $\text{C}_{252}\text{H}_{435}\text{N}_{56}\text{O}_{91}$ 5705.47.

Tetradecavalent conjugate 134. Compound **134** was prepared following Zemplen conditions, starting from **133** (138 mg, 16 μmol). Yield: 100 mg (quantitative). $[\alpha]_{\text{D}} + 30.5$ (c 0.58, 1:1 MeOH- H_2O). IR 3323 cm^{-1} .

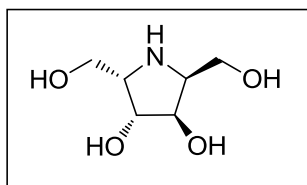
^1H NMR (400 MHz, D_2O , 328 K) δ 1.12-1.36, (m, 140 H, H-9' to H-13'), 1.40-1.55 (m, 28 H, H-8'), 1.66-1.87 (m, 28 H, H-14'), 2.18-2.34 (m, 28 H, H-1a' and H-5'), 2.51-2.68 (m, 14 H, H-7'a), 2.68-2.85 (m, 14 H, H-7'b), 3.03 (br dd, 14 H, $J = 11.3$ and 4.1 Hz, H-1b'), 3.27 (t, 14 H, $J = 8.8$ Hz, H-3'), 3.43 (t, 14 H, $J = 8.6$ Hz, H-4'), 3.52-3.66 (m, 21 H, H-2' and H-2), 3.83-3.91 (m, 28 H, H6'), 3.91-4.09 (m, 35 H, H-3, H-4, H-5, H-6a and H-6b), 4.15 (br t, 14 H, $J = 7.1$ Hz, H-15), 4.23 (br t, 14 H, $J = 7.0$ Hz, H-15), 4.63-4.88 (m, 28 H, H-7 and H-10), 5.34 (br s, 7 H, H-1), 7.81 (s, 7 H, H-9 or H-12), 7.98 (s, 7 H, H-9 or H-12).

^{13}C NMR (100 MHz, D_2O , 323 K) δ 24.4, 24.5 (C-8'), 26.9, 27.1, 28.1, 28.2, 29.4, 29.6, 29.9, 30.1, 30.5, 30.7 (C-9' to C-14'), 50.8, 50.9 (C-15'), 53.2 (C-7'), 56.81, 56.84

(C-1'), 59.0 (C-6'), 61.6 (C-6), 64.8 (C-7 or C-10), 66.3 (C-5'), 66.8 (C-7 or C-10), 69.9 (C-2'), 71.2 (C-4'), 73.2 (C-5), 79.5 (C-3'), 79.6 (C-4), 81.1 (C-2), 83.7 (C-3), 124.8, 125.1 (C-9 and C-12), 144.47, 144.55 (C-8 and C-11).

MALDI-TOF-MS m/z 6294.59 $[M + H]^+$, calcd. for $C_{294}H_{519}N_{56}O_{91}$ 6296.87.

2,5-Dideoxy-2,5-imino-L-idoitol (140)



Compound **138** (81 mg, 0.174 mmol) was dissolved in 1,4-dioxane (4 mL) and NaOAc (29 mg, 0.348 mmol) and Pd/C (32 mg) were added. The mixture was stirred at room temperature under hydrogen atmosphere (1atm) for 24 h. After complete conversion of starting material, 2 M HCl (1mL) was added and the mixture was stirred overnight. Then, the catalyst was filtered off and the solution concentrated. The residue was loaded onto a column of dowex (50W-X8, H^+), washed with EtOH and water and the amine liberated with 2 M NH_3 (aq). The ammoniacal fractions was concentrated under reduced pressure to give the iminosugar (26 mg, 92 %) as a pale yellow oil. $[\alpha]_D^{25}$ -7.25 (c 0.295, H_2O). ν_{max} (thin film) 3347 (s, NH/OH).

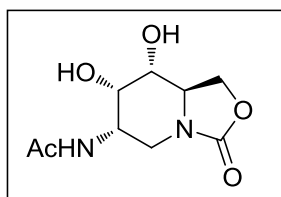
1H NMR (400 MHz, D_2O) δ 4.10 (d, 1 H, $J_{2,3} = 2.5$ Hz, H-3), 3.89 (dd, 1 H, $J_{1a,1b} = 10.4$ Hz, $J_{1a,2} = 6.8$ Hz, H-1a), 3.80-3.84 (m, 1 H, H-2), 3.79 (dd, 1 H, $J_{1b,2} = 6.6$ Hz, H-1b).

^{13}C NMR (100 MHz, D_2O) δ 75.1 (C-3), 63.4 (C-2), 57.9 (C-1),

HRMS (ESI +ve): $C_6H_{14}NO_4$ found 164.0912, $(M + H)^+$ requires 164.0917.

LRMS (ESI +ve): 164 (100 %, $[M+Na]^+$).

Preparation of *N*-((6*S*,7*S*,8*R*,8*aR*)-7,8-dihydroxy-3-oxohexahydro-3*H*-oxazolo[3,4-*a*]pyridin-6-yl)acetamide (**156**).



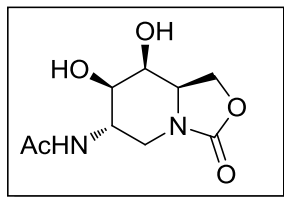
To a solution of **155** (98 mg, 0.5 mmol) in acetone/H₂O 10:1 (8 mL) was added *N*-methylmorpholine-*N*-oxide (150 mg, 1.2 mmol) and K₂OsO₄·2H₂O (18 mg, 10 %) and the solution was stirred at rt until no starting material was observed. Then Na₂S₂O₃ (130 mg, 0.8 mmol) was added and the crude was stirred for 30 minutes. MgSO₄ was added to the crude and then filtered over celite and washed with acetone. The crude was purified in silica gel using CH₂Cl₂ to CH₂Cl₂/MeOH (85:15) to give **156** as a white solid. Yield: (61 mg, 53%). *R*_f 0.14 (9:1 CH₂Cl₂-MeOH). [α]_D²⁵ -12.6 (*c* 0.26, MeOH). Mp 219-222 °C. ν_{max} (thin film) 386, 1737, 1715, 1630, 1426, 1244, 1079, 1017 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 4.47 (t, 1 H, *J* = 8.5 Hz), 4.25 (dd, 1 H, *J* = 8.5, 4.5 Hz), 3.95 (t, 1 H, *J* = 2.5 Hz), 3.87 (m, 2 H), 3.61 (dd, 1 H, *J* = 12.5, 5.5 Hz), 3.47 (dd, 1 H, *J* = 10.0, 2.5 Hz), 3.05 (t, 1 H, *J* = 12.5 Hz), 1.98 (s, 3 H).

¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ 173.0 (CO), 159.4 (CO), 72.3 (CH), 71.4 (CH), 67.5 (CH₂), 54.5 (CH), 49.4 (CH), 39.5 (CH₂), 22.6 (CH₃).

HRMS calcd. for C₉H₁₅N₂O₅: 231.09755, found 231.09762. Anal. Calcd. for C₉H₁₄N₂O₅: C, 46.95; H, 6.13; N, 12.17; found C, 47.03; H, 6.21; N, 12.21.

Preparation of *N*-((6*S*,7*R*,8*S*,8*aR*)-7,8-dihydroxy-3-oxohexahydro-3*H*-oxazolo[3,4-*a*]pyridin-6-yl)acetamide (**157**).



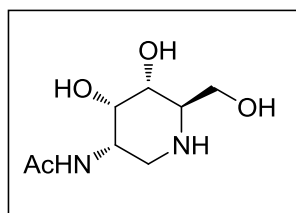
To a solution of **155** (98 mg, 0.5 mmol) in acetone/H₂O 10:1 (8 mL) was added *N*-methylmorpholine-*N*-oxide (150 mg, 1.2 mmol) and K₂OsO₄·2H₂O (18 mg, 10%) and the solution was stirred at rt until no starting material was observed. Then Na₂S₂O₃ (130 mg, 0.8 mmol) was added and the crude was stirred for 30 minutes. MgSO₄ was added to the crude and then filtered over celite and washed with acetone. The crude was purified in silica gel using CH₂Cl₂ to CH₂Cl₂/MeOH (85:15) to give **157** as a white solid. Yield: (15 mg, 13%). *R*_f 0.08 (9:1 CH₂Cl₂-MeOH). Mp 282-284 °C. [α]_D²⁵ + 24.3 (*c* 0.13, H₂O). ν_{\max} (thin film) 3314, 1733, 1655, 1533, 1456, 1437, 1104 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 4.37 (s, 1 H), 4.36 (d, 2 H, *J* = 2.0 Hz), 4.10 (m, 1 H, *J* = 11.0, 5.4 Hz), 3.93 (m, 2 H, *J* = 13.0, 6.0, 2.0 Hz), 3.82 (t, 1 H, *J* = 2.0 Hz, 1H), 3.56 (dd, 1 H, *J* = 10.5, 2.0 Hz), 2.71 (dd, 1 H, *J* = 13.0, 11.0 Hz), 1.98 (s, 3 H).

¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ 174.8 (CO), 159.9 (CO), 72.8 (CH), 69.9 (CH), 64.9 (CH₂), 57.9 (CH), 47.3 (CH), 43.4 (CH₂), 22.9 (CH₃).

HRMS calcd. for C₉H₁₅N₂O₅: 231.09755, found 231.09753. Anal. Calcd. for C₉H₁₄N₂O₅: C, 46.95; H, 6.13; N, 12.17; found C, 47.02; H, 6.25; N, 11.83.

Preparation of 2-acetamido-1,2-didesoxy-D-allonojirimicina (**158**).



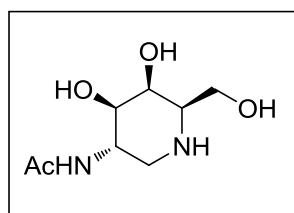
To a solution of **156** (47 mg, 0.2 mmol) in MeOH-H₂O (9:1, 5 mL) was added 6 M NaOH (0.34 mL, 2.0 mmol) and the solution was heated at reflux until no starting material was observed. Solvent was removed under reduced pressure and the crude was purified by column chromatography (73:25:2 CH₂Cl₂-MeOH-NH₃) to give **158** as a white solid. Yield: 17 mg (40%). *R_f* 0.05 (80:18:2 CH₂Cl₂-MeOH-NH₃). Mp 170-172 °C. $[\alpha]_D^{25} + 24.4$ (*c* 0.13, CH₃OH). ν_{\max} (thin film) 3270, 2930, 1560, 1409, 1078, 1014 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 4.03 (t, 1 H, *J* = 2.5 Hz), 3.81 (dd, 1 H, *J* = 11.0, 3.0 Hz), 3.69 (dd, 1 H, *J* = 11.0, 5.5 Hz), 3.48 (dd, 1 H, *J* = 10.0, 3.0 Hz), 3.17 (ddd, 1 H, *J* = 11.0, 5.5, 2.5 Hz), 3.00-2.85 (m, 3 H), 1.92 (s, 3 H).

¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ 179.2 (CO), 70.00 (CH), 69.8 (CH), 61.9 (CH₂), 56.7 (CH), 51.2 (CH), 43.4 (CH₂), 23.4 (CH₃).

HRMS (ES) calcd. for C₉H₁₅N₂O₅: 205.118228, found 205.11832.

Preparation of 2-acetamido-1,2-didesoxy-D-galactonojirimicina (**159**).



To a solution of **159** (10 mg, 0.04 mmol) in MeOH-H₂O (9:1, 5 mL) was added 6 M NaOH (0.072 mL, 0.43 mmol) and the solution was heated at reflux until no starting material was observed. Solvent was removed under reduced pressure and the crude was purified by column chromatography (73:25:2 CH₂Cl₂-MeOH-NH₃) to give **159** as a white solid. Yield: 3.5 mg (38%). Spectroscopic data was consistent with the one reported on the literature.^{25,26}

¹ L. Grycov, R. Dommissie, L. Pieters, R. Marek, *Magn. Reson. Chem.* **2009**, *47*, 977-981.

-
- ² C. S. Handlose, M. R. Chakrabarty, M. W. Mosher, *J. Chem. Ed.* **1973**, *50*, 7, 510-511.
- ³ K. Higaki, L. Li, U. Bahrudin, S. Okuzawa, A. Takamuram, K. Yamamoto, K. Adachi, R. C. Paraguisson, T. Takai, H. Ikehata, L. Tominaga, I. Hisatome, M. Iida, S. Ogawa, J. Matsuda, H. Ninomiya, K. Sakakibara, K. Ohno, Y. Suzuki, E. Nanba, *Hum. Mutat.* **2011**, *32*, 843-852.
- ⁴ H. Iwasaki, H. Watanabe, M. Iida, S. Ogawa, M. Tabe, K. Higaki, E. Nanba, Y. Suzuki, *Brain Dev.* **2006**, *28*, 482-486.
- ⁵ A. Takamura, K. Higaki, H. Ninomiya, T. Takai, J. Matsuda, M. Iida, K. Ohno, Y. Suzuki, E. Nanba, *J. Neurochem.* **2011**, *118*, 399-406.
- ⁶ A. Takamura, K. Higaki, K. Kajimaki, S. Otsuka, H. Ninomiya, J. Matsuda, K. Ohno, Y. Suzuki, E. Nanba, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *367*, 616-622.
- ⁷ a) J. Matsuda, O. Suzuki, A. Oshima, Y. Yamamoto, A. Noguchi, K. Takimoto, M. Itoh, Y. Matsuzaki, Y. Yasuda, S. Ogawa, Y. Sakata, E. Nanba, K. Higaki, Y. Ogawa, L. Tominaga, K. Ohno, H. Iwasaki, H. Watanabe, R. O. Brady, Y. Suzuki, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **2003**, *100*, 15912-15917; b) Y. Suzuki, S. Ichinomiya, M. Kurosawa, M. Ohkubo, H. Watanabe, H. Iwasaki, J. Matsuda, Y. Noguchi, K. Takimoto, M. Itoh, M. Tabe, M. Iida, T. Kubo, S. Ogawa, E. Nanba, K. Higaki, K. Ohno, R. O. Brady, *Ann. Neurol.* **2007**, *62*, 671-675; c) J. Matsuda, O. Suzuki, A. Oshima, A. Ogura, Y. Noguchi, Y. Yamamoto, T. Asano, K. Takimoto, K. Sukegawa, Y. Suzuki, M. Naiki, *Glycoconjugate J.* **1997**, *14*, 729-736.
- ⁸ G. Zemplén, E. Pascu, Ver. Deut, Chem. Ges. **1929**, *62*, 1613-1614.
- ⁹ K. Dax, B. Gaigg, V. Grassberger, B. Kölblinger, A. E. Stütz, *J. Carbohydr. Chem.* **1990**, *9*, 479-499.
- ¹⁰ A. Kato, N. Kato, E. Kano, I. Adachi, K. Ikeda, L. Yu, T. Okamoto, Y. Banba, H. Ouchi, H. Takahata, N. Asano, *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 2036-2044.
- ¹¹ V. M. Díaz Pérez, M. I. García-Moreno, C. Ortiz Mellet, J. Fuentes, J. C. Díaz Arribas, F. J. Cañada, J. M. García Fernández, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 136-143.

-
- ¹² G. Schitter, E. Scheucher, A. J. Steiner, A. E. Stütz, M. Thonhofer, C. A. Tarling, S. G. Withers, J. Wicki, K. Fantur, E. Paschke, D. J. Mahuran, B. A. Rigat, M. Tropak, T. M. Wrodnigg, *Beilstein J. Org. Chem.* **2010**, *6*, 21.
- ¹³ M. Aguilar-Moncayo, M. I. García-Moreno, A. E. Stütz, J. M. García Fernández, T. M. Wrodnigg, C. Ortiz Mellet, *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 7439-7445.
- ¹⁴ H. Bruyère, A.D. Westwell, A. T. Jones, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 2200-2203.
- ¹⁵ H. Munch, J. S. Hansen, M. Pittelkow, J. B. Christensen, U. Boas, *Tet. Lett.* **2008**, *49*, 3117-3119.
- ¹⁶ M. Aguilar, P. Díaz-Pérez, M. I. García-Moreno, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 1995-1998.
- ¹⁷ B. J. Ayers, N. Ngo, S. F. Jenkinson, R. F. Martínez, Y. Shimada, I. Adachi, A. C. Weymouth-Wilson, A. Kato, G. W. J. Fleet, *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 7777-7792.
- ¹⁸ a) H. S. Overkleeft, J. van Wiltenburg, U. K. Pandit, *Tetrahedron* **1994**, *50*, 4215-4224;
b) V. Hoos, A. B. Naughon, A. Vasella, *Helv. Chim. Acta* **1993**, *76*, 1802-1807.
- ¹⁹ J. Iehl, J.-F. Nierengarten, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 7306-7309.
- ²⁰ a) F. G. Calvo-Flores, J. Isac-García, F. Hernández-Mateo, F. Pérez-Balderas, J. A. Calvo-Asín, E. Sánchez-Vaquero, F. Santoyo-González, *Org. Lett.* **2000**, *2*, 2499-2502;
b) K. Takeo, H. Mitoh, K. Uemura, *Carbohydr. Res.* **1989**, *187*, 203-221.
- ²¹ F. Ortega-Caballero, J. J. Giménez-Martínez, A. Vargas-Berenguel, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 2389-2392.
- ²² S. Ward, C. -C. Ling, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 4853-4861.
- ²³ A. de la Fuente, R. Martín, T. Mena-Barragán, X. Verdaguer, J. M. García Fernández, C. Ortiz Mellet, A. Riera, *Organic Letters* **2013**, *15*, 3638-3641.
- ²⁴ M. Aguilar, P. Díaz-Pérez, M. I. García-Moreno, C. Ortiz Mellet, J. M. García Fernández, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 1995-1998.

-
- ²⁵ a) D. Best, P. Chairatana, A. F. G. Glawar, E. Crabtree, T. D. Butters, F. X. Wilson, C. Yu, W. Wang, Y. Jia, I. Adachi, A. Kato, G. W. J. Fleet, *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 2222-2224; b) A. M. Schueller, F. R. Heiker, *Carbohydr. Res.* **1990**, *203*, 308-13; c) S. H. Kang, D. H. Ryu, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 607-610.
- ²⁶ A. F. G. Glawar, D. Best, B. J. Ayers, S. Miyauchi, S. Nakagawa, M. Aguilar-Moncayo, J. M. García Fernández, C. Ortiz Mellet, E. V. Crabtree, T. D. Butters, F. X. Wilson, A. Kato, G. W. J. Fleet, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 9341-9359.